67/D

Vol. 24 1957

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •

N.S.P.
B.A.M.
M.M.

SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
1 DEC 1959

Os Arquivos do Instituto Biológico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em número limitado, poderão ser adquiridos ao preço de Cr$ 2,00 no Serviço de Vendas do Instituto Biológico.

Toda a correspondência referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Diretor Geral do Instituto Biológico, (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) Caixa postal 7119, São Paulo, Brasil.

Diretor Geral: Paulo Nóbrega

The "Arquivos do Instituto Biológico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles may be purchased for Cr$ 2.00 from the Serviço de Vendas of the Instituto Biológico.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Diretor Geral do Instituto Biológico, P. O. Box 7119, São Paulo, Brazil.

PREÇO DÊSTE NÚMERO CR$ 50,00

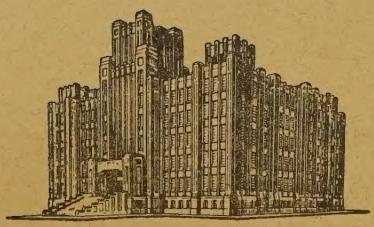
Vol. 24 1957

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

SUMÁRIO

Pags.

1. **Cury, R. e Troise, C.** — TÉCNICA DE BORBULHAMENTO NO PREPARO DE VACINAS — I. ESTUDOS SÔBRE VACINAS CONTRA INFECÇÕES POR *Salmonella Dublin*. Com 1 fig. e 9 tabelas no texto.
Bubbling technique in the preparation of vaccines — I. Studies on vaccines against Salmonella Dublin infections . 1-34

2. **Cury, R. e Troise, C.** — TÉCNICA DE BORBULHAMENTO NO PREPARO DE VACINAS — II. ESTUDOS SÔBRE VACINAS CONTRA INFECÇÕES POR *Salmonella abortivoequina, gallinarum, choleraesuis* e *kunzendorf*. Com 4 tabelas no texto.
Bubbling technique in the preparation of vaccines — II. Studies on vaccines against infections by Salmonella abortivoequina, gallinarum, choleraesuis and kunzendorf 35-45

3. **Cury, R. e Troise, C.** — TÉCNICA DE BORBULHAMENTO NO PREPARO DE VACINAS — III. EXPERIÊNCIAS DE CAMPO COM VACINAS BORBULHADAS CONTRA SALMONELOSES. Com 3 tabelas no texto.
Bubbling technique in the preparation of vaccines — III. Field trials with bubbling vaccines against Salmonella infections 47-60

4. **Cury, R. e Troise, C.** — TÉCNICA DE BORBULHAMENTO NO PREPARO DE VACINAS — IV. ESTUDOS SÔBRE AÇÃO DA CLOROFILA NAS ENDOTOXINAS DAS SALMONELAS E SEU EMPREGO NAS VACINAS BORBULHADAS. Com 3 tabelas no texto.
Bubbling technique in the preparation of vaccines — IV. Studies on the effect of chorophyll on the endotoxins of Salmonella and its use in bubbled vaccines 61-68

5. **Orlando, A.** — O VALOR DO ÓLEO DE QUENOPÓDIO E DAS PLANTAS DE "ERVA DE SANTA MARIA" — *CHENOPODIUM AMBROSIOIDES, L.* VAR. *ANTHELMINTICUM* (L.) GRAY NO CONTROLE A NEMATOIDES QUE ATACAM RAIZES DE VEGETAIS CULTIVADOS. Com 2 figs. no texto e estampas 1 e 2.
The efficiency of the oleum chenopodii and of extracts of the wormeseed plant — Chenopodium ambrosioides, L. var. anthelminticum (L.) Gray. — for the control of rootborers 69-80

(CONTINUA)

Págs.

6. **Schwarz, Käthe** — ESPECTROS U. V. DOS PRODUTOS DA DECOMPOSIÇÃO ESPONTÂNEA DO ÁCIDO INDOLPIRÚVICO. Com 5 figs. no texto.
Spectrography of the products of the spontaneous decomposition of indolepyruvic acid 81-91

7. **Pereira Jr. J.** — MÉTODO RÁPIDO DA LIBERAÇÃO DA MUCILAGEM DO CAFÉ DESPOLPADO PELA ATIVAÇÃO DE SUAS PRÓPRIAS ENZIMAS — II. DESGOMAGEM RÁPIDA DO CAFÉ DESPOLPADO EM CONTRASTE COM A FERMENTAÇÃO PROLONGADA: MUCILAGEM BRUTA LIBERADA. Com 2 tabelas no texto.
A method for quick freeing of pulped coffee beans from their mucilage through activaction of its own enzymes — II. Quick freeing of pulped coffee beans mucilage as constrasted with lengthy fermentation: the crude mucilage 93-103

8. **Calcagnolo, G.** e **Leiderman, L.** — AS PULVERIZAÇÕES CONCENTRADAS NO COMBATE AO "BICHO MINEIRO" DAS FÔLHAS DO CAFEEIRO, *PERILEUCOPTERA COFFEELLA* (GUÉRIN-MÉNEVILLE) *(LEPIDOPTERA-BUCCOLATRICIDAE)*. Com 7 tabelas no texto.
High concentrate sprays on coffee leaf miner control, Perileucoptera coffeella (Guérin-Méneville), (Lepidoptera-Buccolatricidae) 105-121

9. **Pinto da Fonseca, J.** — TRÊS NOVAS ESPÉCIES DE COCCIDEOS DO BRASIL, SÔBRE CAFEEIRO *(HOMOPTERA-COCCIDAE)*. Com 14 figs. no texto e estampa 3.
Three new species of brazilian coccidae on coffea trees (Homoptera-Coccidae) 123-135

10. **Puzzi, D.** e **Orlando, A.** — ENSÁIOS PARA SELEÇÃO DE SUBSTÂNCIAS, SOB FORMA LÍQUIDA, COMO ATRAENTES PARA A "MOSCA DO MEDITERRÂNEO" — *CERATITIS CAPITATA* (WIED.). Com 11 tabelas no texto.
Screening tests of chemicals for liquid bait in traps as attrahents to "Mediterranean fruit fly" — Ceratitis capitata (Wied.) 137-149

11. **Puzzi, D.** e **Orlando, A.** — ESTUDOS DE SUBSTÂNCIAS ATRATIVAS À "MOSCA DO MEDITERRÂNEO" — *CERATITIS CAPITATA* (WIED.) NA FORMA DE ISCAS SÊCAS, COM O EMPRÊGO DE UMA NOVA TÉCNICA. Com 11 tabelas no texto e estampas 4 e 5.
Studies on some attracting substances employed as dry baits to the "Mediterranean fruit fly" — Ceratitis capitata (Wied.) and using a new technic 151-161

(CONTINUA)

Págs.

12. **Castro, M. P.** e **Mello, D.** — TECIDO RENAL DE COBAIA CULTIVADO POR NOVA TÉCNICA E SUA SENSIBILIDADE AO VIRUS DA FEBRE AFTOSA. Com a estampa 6.
Guinea pig renal tissue cultivated by a new technique and its susceptibility to the foot-and-mouth disease virus 163-167

13. **Bitancourt, A. A., Schwarz, K.** e **Nogueira, A. P.** — A DECOMPOSIÇÃO ESPONTÂNEA DE ALGUNS DERIVADOS INDÓLICOS — I. MÉTODOS EXPERIMENTAIS.
Spontaneous decomposition of some indole derivatives — I. Experimental methods 169-182

14. **Schwarz, K.** e **Bitancourt, A. A.** — A DECOMPOSIÇÃO ESPONTÂNEA DE ALGUNS DERIVADOS INDÓLICOS — II. ÁCIDO INDOLPIRÚVICO — Com 3 figs. no texto.
The spontaneous decomposition of some indole derivatives — II. Indolepyruvic acid 183-197

15. **Corrêa, R.** — CARÊNCIA DE COBALTO EM BOVINOS — I. ESTUDO CLINICO E DEMONSTRAÇÃO EXPERIMENTAL DA EXISTÊNCIA DA DOENÇA NO BRASIL — Com as estampas 7 a 14.
Cobalt deficiency in bovines 199-227

16. **Guida, V. O.** e **Forster, J. P.** — AÇÃO ESTIMULANTE DO *B. COAGULANS*, ADMINISTRADO POR VIA ORAL, NO CRESCIMENTO DE RATOS ALBINOS. Com 1 fig. no texto.
Stimulant action of B. coagulans, administrated by oral way, in the growing of albino rats 229-236

17. **Guida, V. O.** — SÔBRE A INFLUÊNCIA DE BACTÉRIAS ESPORULADAS AERÓBIAS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGAS — EFEITO SÔBRE A POSTURA E O PÊSO DOS OVOS — Com 2 tabelas no texto.
Sporulated aerobic bacteria as a supplement for pullet feeding — Study of the influence on the weight of eggs and on the laying capacity 237-241

18. **Pinto da Fonseca, J.** — UMA NOVA ESPÉCIE DE *"DIORYMERELLUS"* (COL. *CURCULIONIDAE BARININAE) PRE*-JUDICIAL ÀS ORQUIDEAS — Com 2 figs. no texto.
The new specie of "Diorymerellus" (Col. Curculionidae Barininae), serious pest of orchids 243-246

19. **Guida, V. O.** e **Troise, C.** — ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A PEPTONA DE SOJA E A PEPTONA WITTE NA OBTENÇÃO DE TOXINAS ALTAMENTE TOXÍGENAS DE *CL. TETANI* — VALOR ANTIGÊNICO DAS ANATOXINAS PREPARADAS COM AS TOXINAS OBTIDAS — Com 6 tabelas no texto.
A study of the influence of the meal and peptone of soybean and witte's peptone on the production of tetanal toxin and on the antigenicity of the toxoid 247-256

(CONTINUA

Pags.

20. **Kramer, M.** — EXTERMINAÇÃO OU CONTRÔLE DE PLANTAS LENHOSAS E ARBÓREAS NAS PASTAGENS DE SÃO PAULO. Com as estampas 15 e 16
Chemical control of shrubs, brambles and woody plants in the pastures of S. Paulo 257-768

Vol. 24 — Artigo 1 Novembro de 1957

TÉCNICA DE BORBULHAMENTO NO PREPARO DE VACINAS

I — ESTUDOS SÔBRE VACINAS CONTRA INFECÇÕES POR *SALMONELLA DUBLIN*

POR

R. Cury e C. Troise

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 1 fig. e 9 tabelas no texto

As técnicas até hoje descritas para o preparo de vacinas contra salmoneloses não permitem obtenção de produtos que satisfaçam a totalidade das exigências da imunologia. Dentre os principais inconvenientes apontados por muitos autores, figuram:

1 — reações desagradáveis locais ou gerais, às vêzes graves, nos individuos submetidos à imunização, (19) (55) (30) (68) devidas, como hoje se crê, à existência de endotoxinas na vacina (89) (29) (91);

2 — a presença das formas rugosas dos germes, em percentagem variável, menor nos produtos feitos com muito cuidado, trazendo como conseqüência a baixa do poder de proteção da vacina (4) (31).

Os antígenos que mais se aproximam das condições ideais, sanando em parte os inconvenientes citados, são muito trabalhosos e pouco práticos.

Considerando êstes fatos e também o importante papel das salmonelas nas infecções, com especial referência a *Salmonella dublin* em patologia veterinária, planejamos e executamos o presente trabalho tendo como objetivo a obtenção de uma vacina onde não figurassem os inconvenientes citados.

Após muitas experimentações, divergindo dos métodos usuais, verificamos a possibilidade de se obter excelentes vacinas contra a *Salm. dublin*, pela técnica de semeadura dos germes em meios de cultura líquidos, submetidos a um arejamento contínuo.

Vários sistemas, simples ou combinados, de arejamento dos meios de cultura, pelo uso de ar atmosférico, de misturas gasosas ou de substâncias gasosas têm sido descritos e empregados por muitos autores (6) (11), com as mais diversas finalidades:

a) borbulhamento (90) (51) (87) (88) (92) (27) (65) (72) (59) (70) (26) (18) (28) (32) (3) (12) (13) (54) (56) (23); b) borbulhamento e agitação por rotor de pás (21) (35); c) borbulhamento e agitação mecânica dos recipientes (24); d) agitação mecâni-

ca dos recipientes (7) (77) (22) (25) (78) (37) (74) (36) (44); e) rotor de pás (47) (48); f) rotor de pás e agitação mecânica (41) (42) (38) (85); g) passagem de ar atmosférico ou outros gases sôbre a superfície do meio líquido de cultura (71) (73) (79) (16); h) agitação mecânica e fluxo de gás sôbre a superfície do meio líquido de cultura (80); i) arejamento por manter o meio de cultura em fluxo constante (52); j) arejamento prévio, com fluxo superficial de oxigênio ou de gás carbônico, antes da semeadura (50) (9).

Estudando todas estas técnicas e variantes, optamos pelo uso do borbulhamento de ar, por se amoldar melhor às nossas condições de trabalho, mostrando algumas vantagens características:

1 — utiliza um aparelho fácil de ser construído ou improvisado, sem qualquer sistema de movimento mecânico;
2 — êste aparelho é de manipulação simples e isento de possibilidades de contaminação do meio de cultura. Deve-se apenas observar os cuidados habituais de laboratório, sem necessidade de técnica apurada.

Embora não se negue a possibilidade de sucesso pelo uso de outras técnicas, o sistema de arejamento pelo borbulhamento de ar foi plenamente satisfatório para a finalidade objetivada.

MÉTODOS DE TRABALHO

Germes usados — Nêste trabalho usamos a *Salmonella dublin*, amostras n.os 7657, 6924, 8883, 7375 e bez. 118, todas recebidas da Secção de Epizootias, do Instituto Biológico de S. Paulo.

Os germes foram mantidos em laboratório em agar chocolate inclinado (em tubos) e freqüentemente passados no camondongo para manter a virulência. Reidentificamos bioquímica e sorològicamente as amostras várias vezes no decorrer do trabalho.

Técnica de borbulhamento — Faz-se passar o ar atmosférico, por aspiração, por intermédio de uma trompa de vácuo (trompa d'água) através do meio de cultura (Fig. 1).

O ar aspirado penetra num primeiro filtro (A), formado de um tubo grosso de vidro cheio de algodão cardado (linter). Daí, passa a um frasco lavador (B), com água distilada estéril, donde sai, passando em seguida através de outro filtro (C) (de algodão, semelhante ao primeiro filtro), e vai borbulhar no meio de cultura.

O borbulhador (H) consiste num tubo de vidro que atravessa o tampão de borracha do frasco de cultura e mergulha no meio líquido terminando, no interior dêste, com a ponta dilatada em cone cuja base tem um crivo.

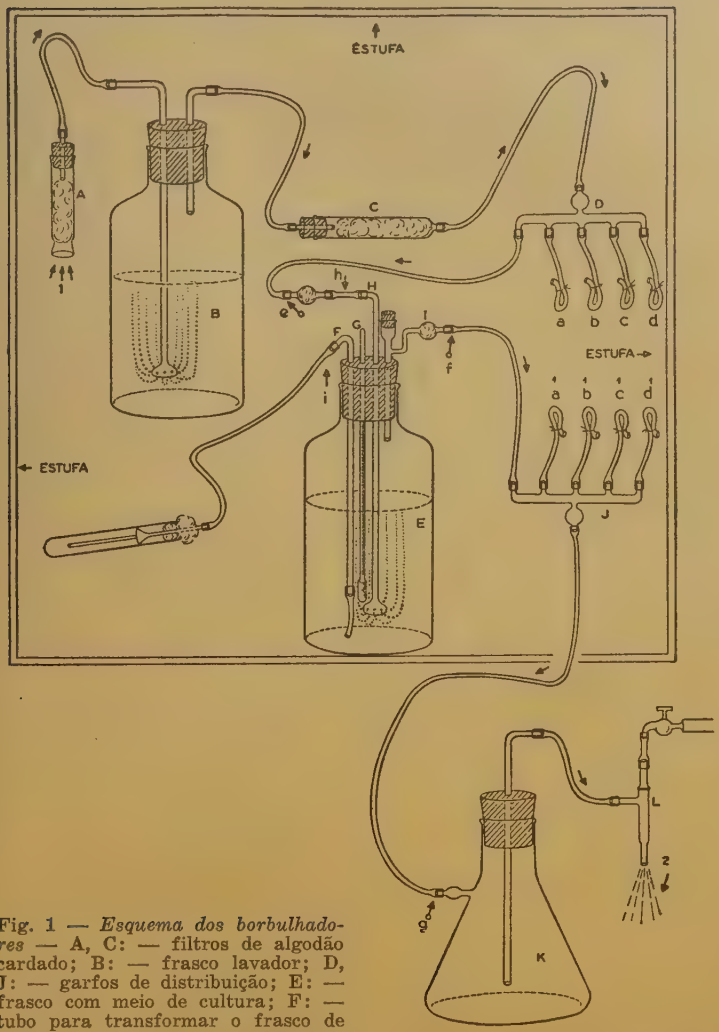


Fig. 1 — *Esquema dos borbulhadores* — A, C: — filtros de algodão cardado; B: — frasco lavador; D, J: — garfos de distribuição; E: — frasco com meio de cultura; F: — tubo para transformar o frasco de cultura em "pissette" para distribuição; G: — termômetro; H: — tubo com ponta em crivo, de onde sai o ar em bolhas (borbulhador); I: — tubo por onde se aspira o ar; com uma derivação para semeadura e colheita de amostras; quando o frasco é transformado em "pissette" de distribuição por êle se insufla o ar; K: — frasco de Kitasato; L: — trompa de água (trompa de vácuo); 1: — entrada de ar; 2: — saída do ar, junto com a agua da trompa; a, b, c, d, a^1, b^1, c^1, d^1: — ligações para outros frascos com meio de cultura; e, f, g: — pontos onde o sistema é desconetado para esterilização; h, i: — pontos onde se apertam as pinças de Hoffmann ou de Mohr, durante a esterilização.

O ar borbulhado é depois levado a um frasco de Kitasato (K), e finalmente sai pela trompa aspirante (L) junto com a água.

O conjunto, isto é, filtros, frasco lavador e balões de cultura, é colocado dentro da estufa; a trompa e o frasco de Kitasato ficam em ambiente, ligados para o interior da estufa, por canalização de tubos de borracha.

Pode-se trabalhar ao mesmo tempo com vários balões de cultura usando "garfos" (D e J) para distribuição do ar.

A principal função do frasco lavador (B) é a de umidecer o ar que vai borbulhar no meio de cultura, evitando a excessiva evaporação dêste. O frasco de Kitasato (K) serve como câmara de expansão para uniformizar o ar aspirado e evitar que um refluxo de água pela trompa possa atingir o meio de cultura.

Cada balão de cultura (E) é fechado por rolha de borracha atravessada por três tubos de vidro: um para entrada de ar (borbulhador), (H) munido na entrada com uma bola de vidro cheia de algodão cardado; outro para saída do ar, munido também de bola de vidro cheia de algodão cardado, com uma derivação vedada por rolha para semeadura e retirada de amostras (I) e um terceiro tubo que vai ao fundo do frasco, permitindo transformá-lo em "pissete" para distribuição (F). Um dos balões leva um termômetro (G) para indicar a temperatura interna do meio de cultura.

Todo o sistema borbulhador é esterilizado em autoclave. Utilizou-se no trabalho o seguinte modo de proceder:

1 — Colocar o meio de cultura no frasco borbulhador, vedar as entradas dos tubos de vidro com capuzes de papel amarrados e prender com pinça de Mohr ou de Hoffmann os pontos *h* e *i* (Fig. 1) para evitar a ascenção do líquido nos tubos durante a esterilização. Esterilizar os frascos borbulhadores, cada um em separado; 2 — o conjunto de entrada do ar: filtros, frasco lavador com água, garfo e tubulações de borracha são esterilizados já ligados entre si, fechando-se as entradas com tufos de algodão, vedados por capuzes de papel amarrados; 3 — o conjunto de saída do ar é também esterilizado do mesmo modo.

Após a esterilização, as ligações do sistema são feitos flambando-se as partes dos tubos de vidro com bico de Bunsen ou lamparina de álcool e mergulhando-se as pontas dos tubos de borracha em álcool, após estarem os frascos borbulhadores semeados e colocados em seus lugares na estufa.

Meios de cultura — Procuramos obter um meio de cultura que oferecesse as seguintes qualidades: manipulação pouco trabalhosa, ingredientes de obtenção fácil, composição simples, baixo custo de elaboração.

Para isso no decorrer deste trabalho, experimentamos 18 tipos de meios de cultura e variantes. Alguns meios ensaiados eram de manipulação trabalhosa, motivo pelo qual, embora dessem resultados satisfatório, foram substituídos por outros mais simples.

O meio de cultura que melhor se adaptou às nossas finalidades foi

caldo Hottinger + levedo + glicose + fator acessório de crescimento

Hottinger, "solução-mãe"	50 cm³
Água de levedo	100 cm³
Água de torneira q.s. para	1000 cm³

Observações: o Hottinger, "solução-mãe" contém 10% de cloreto de sódio.

Misturar, ajustar o pH 7,2-7,4 (com soda 1 N), filtrar em papel-xarope e esterilizar a 120°C durante 30 minutos.

Nesta ocasião, juntar assèticamente: solução de glicose a 20% (esteril por filtração) 1 cm³. Juntar em seguida, de acôrdo com as verificações de LEDERBERG (43), assèticamente ao meio de cultura: 15 mg de cloridrato de tiamina (vitamina B 1) por litro. A vitamina B 1 pode ser dissolvida com a glicose e ambas esterilizadas por filtração. O pH final do meio de cultura deve ser 7,2.

Antes da semeadura, o meio permanece na estufa, a 37°C durante 24 ou 48 hs, para verificação de esterilidade.

Preparo do::

Hottinger "solução-mãe": E' o meio básico utilizado no Caldo Hottinger, seu preparo obedeceu às indicações de BIER (8), só que no momento do uso a diluição foi feita de acôrdo com a fórmula citada.

No preparo da "solução-mãe" a digestão deve ser considerada excessiva, quando começar a formação de cristais de tirosina, visíveis na parte interna da parede do recipiente de vidro.

Levedo: O levedo empregado no meio de cultura pode ser acrescentado sob a forma de: 1 — água de levedo fresco, 2 — água de levedo Fleischmann, 3 — extrato de levedo.

Qualquer destas dá bons resultados. A escolha depende apenas da maior ou menor facilidade encontrada no comércio ou na forma de trabalho.

O emprego do levedo nos meios de cultura já é antigo, conforme se vê nos trabalhos de KLINGER (40), NEILL, SUGG, RICHARDSON e FLEMING (58).

Água de Levedo fresco: O levedo fresco, empregado no preparo industrial da cerveja, não oferece resultados uniformes, tornando-se necessário provas prévias de cultura, com os vários tipos disponíveis (levedos de baixa fermentação, levedos de alta fermentação, etc.).

A água de levedo é assim obtida: 1 — centrifugar o mosto (ou deixar decantar no caso de grande quantidade) e lavar 3 vêzes a massa com água de torneira; 2 — adicionar ao depósito água distilada (partes iguais de depósito e água), congelar durante 24 horas; 3 — agitar até descongelar e aquecer a 120°C, 30 minutos; 4 — o produto obtido é decantado, filtrado, distribuido em balões e esterilizado a 120°C durante 30 minutos.

Conserva-se muito bem na câmara fria por largo tempo.

Água de Levedo Fleischmann: Usou-se o "Fermento Fleischmann", em tabletes, fabricado e distribuido pela "Standard Brands of Brazil Inc., Petropolis, Est. do Rio. Juntar:

Levedo	1.000 g
Água distilada	10.000 cm^3

1 — Congelar e descongelar 3 vêzes seguidas: o congelamento é feito em temperatura pouco abaixo de 0°C durante 24 horas, de cada vez; o descongelamento é feito trazendo o recipiente à temperatura ambiente (ou banho morno) e agitando de vez em quando até atingir mais ou menos a temperatura ambiente, voltando então à geladeira; 2 — autoclavar a mistura a + 120°C durante 30 minutos; 3 — decantar, esterilizar e guardar na geladeira ao abrigo da luz, até a ocasião do uso.

Extrato de Levedo: Conforme indicações de RODRIGUES (76).

Levedo Fleischmann ou Levedo fresco centrifugado ou bem decantado	1 kg
Alcool a 60° G.L. (aquecido a 60°) ...	3 litros

Deixar em banho-maria a 60°C, cêrca de 15 minutos, agitando. Deixar em seguida macerar durante aproximadamente 3 a 15 dias, em ambiente. Filtrar em papel. Concentrar no vácuo a mais ou menos 50°C até chegar a 1 litro. Conservar em geladeira.

Na ocasião do uso diluir uma parte de Extrato em nove partes de água e usar no meio de cultura nas proporções indicadas para a água de levedo.

Inóculo para vacina — O inóculo para tôdas as partidas foi preparado de modo idêntico e obedeceu à seguinte seqüência, para cada amostra em separado:

1 — reativação da amostra por inoculação em camondongo. Esta primeira fase do preparo do inóculo é importantissima, porquanto nossa experiência indica que as melhores vacinas contra salmonelas são obtidas com amostras selecionadas pela sua antigenicidade e altamente virulentas. 2 — logo após à morte do animal, o sangue do coração retirado assèticamente é semeado em placa de agar simples e de meio de Teague e incubado 24 hs a 37°C. 3 — colônias típicas isoladas são passadas ao caldo Hottinger e levadas à estufa a 37°C durante 24 hs. 4 — contrôle de pureza do caldo e semeadura de garrafas de Roux com agar simples e em seguida incubação 24 hs a 37°C. 5 — suspensão do crescimento das garrafas de Roux em água fisiológica, constituindo o inóculo. 6 — contrôle bacterioscópico do inóculo e semeadura nos meios de cultura para o preparo de vacina.

Nos casos em que a amostra apresentava inicialmente baixa virulência para o camondongo, as sequências 1 — 2 e 3 foram repetidas várias vêzes, até o germe mostrar-se altamente virulento.

A experiência mostrou que a retirada do sangue do coração logo após a morte dos camondongos inoculados, quando feita com os devidos cuidados de assepsia, com pipeta ou seringa e agulha estéreis, raramente deixava de dar cultura pura. Assim sendo, a seqüência 2, semeadura em placa, pode ser suprimida. Nêste caso, para ainda maior garantia, prevenindo uma invasão de germes secundários após a morte, pode-se retirar o sangue dos camondongos quando ainda em agonia, diluí-lo em caldo Hottinger e semear as garrafas de Roux.

Utilizou-se freqüentemente esta simplificação de técnica, não só pelo fato de maior rapidez de trabalho e ausência de invasão de germes secundários, mas principalmente devido às observações de Rodrigues (75), a propósito do *Clostridium chauvoei*. Verificou êste autor, confirmando vários trabalhos (14) (26) (5) (53), que a matriz obtida em hemocultura primária da cobaia infectada, por semeadura direta do sangue colhido do coração da cobaia em agonia, permite a obtenção de melhores vacinas. As provas de proteção de vacinas obtidas por êste método foram mais favoráveis que as de vacinas onde esta técnica não foi usada.

Doses vacinantes — Não tendo encontrado na literatura indicações para as doses imunizantes de vacina contra salmonelose para o camondongo, estabelecemos em nosso trabalho as doses de 0,1, 0,2 e 0,4 cm^3 por via subcutânea. Estas doses foram usadas em todas as provas de proteção e para todos os tipos de vacinas ensaiados.

Em relação ao tamanho do camondongo as doses foram talvês exageradas, mas êste fato não nos preocupou porquanto tratava-se de estabelecer valores protetores comparados de vários tipos de vacinas e não de fixar doses vacinantes para uso no camondongo.

Nas provas onde procuramos verificar a inocuidade das vacinas usamos doses até 1,5 cm.^{3} Doses também exageradas, mas desta vez propositadamente, pois que a vacina que nesta altíssima dose para o camondongo fosse inócua, poucas probabilidades teria de afetar o bezerro.

Doses infectantes — De início, para uso nas provas de proteção, procuramos determinar, para o camondongo, a dose mínima mortal das culturas da salmonela, determinação esta que ofereceu sérias dificuldades. Conforme verificamos em nossos trabalhos de reativação, a oscilação de virulência é mais ou menos rápida nas salmonelas.

Alguns autores (60) (62) (61) (49) (57) preconizam a junção da mucina e de outras substâncias na inoculação de culturas de salmonelas e de outros germes, a fim de exaltar a virulência e "estandardizar" as provas de proteção. FELIX (20) discorda dêstes métodos por julgá-los capazes de conduzir a consideráveis erros.

Procurando evitar êstes artifícios de técnica, conseguimos relativa estabilidade da dose mínima mortal das salmonelas, usando o processo de "ativação contínua", isto é, inoculando a amostra em camondongo, isolando do sangue, logo após a morte, e inoculando em seguida noutro camondongo e assim por diante, num processo contínuo. O germe atinge o seu máximo de virulência e nestas condições de trabalho, a virulência fica então mais ou menos constante para determinada amostra.

No preparo das amostras para inoculações de prova não houve vantagens em usar o meio amido solúvel de CROSSLEY, FERGUSON e BRYDSON (15), que impediria, no dizer dos autores, o aparecimento das formas rugosas de baixa virulência; possivelmente por usarmos no presente trabalho amostras reativadas com freqüência.

SCHOENING, DALE, MOTT e HABERMANN (81) mantêm a virulência da *Salmonella choleraesuis* por liofilização, processo êste que não poude ser ensaiado nas nossas condições de trabalho.

Reações bioquímicas — Nos estudos comparados, usamos várias reações bioquímicas, a fim de verificar as diferenças que pudessem existir nos vários tipos de vacinas e entre as várias amostras de *Salmonella dublin*.

Empregamos no presente trabalho: Aglutinação pela tripaflavina, Reação de Molisch, Reação de Millon e Reação do biureto.

Estas técnicas, cuja precisão e clareza de resultados é a nosso ver discutível, mas que mantivemos no trabalho por nos fornecer indicações gerais aproveitáveis, são explanadas com seus detalhes nos casos onde não encontramos exposições bem definidas na literatura.

Aglutinação pela tripaflavina: Esta prova foi descoberta por ALEXANDRINI e SABATUCCI (1) (2) e bem estudada por PAMPANA (63) (64), HIRSCH (33), SERTIC e BOULGAKOV (82) (83) (84) e é hoje empregada para diferenciar formas rugosas e lisas de uma mesma espécie de germe e não mais para diferenciar espécies diferentes, como se pretendia na idéia inicial.

Usamos a prova em placa pela técnica de Pampana modificada por SERTIC e BOULGAKOV.

HUDDLESON (34) indica a prova da tripaflavina em tubos, mas isto não foi usado na rotina dêste trabalho, por exigir maior prazo para observação dos resultados e pelo fato da prova em placa ter dado excelente resultado.

Reação de Molisch: Juntar 2 gotas de uma solução alcóolica de naftol alfa a 15% (ou 20%) e 1 cm^3 (ou 2) de ácido sulfúrico concentrado para 1 cm^3 da solução (ou suspensão) a ser testada.

Interpretação:

\+ = coloração violeta escuro — presença de alto teor de carbohidratos

± = coloração róseo-violeta — presença de regular quantidade de carbohidratos

— = coloração rósea — presença de pequena quantidade de carbohidratos.

Numa suspensão de germes WHITE (89) considera a reação positiva como indicadora de formas lisas e a negativa indicando formas rugosas.

Reação de Millon: Juntar 0,5 cm^3 (ou 1) do reagente de Millon para proteínas em 3 cm^3 de uma suspensão densa de germes, ferver 5 minutos em banho-maria, retirar e agitar enèrgicamente durante um minuto e em seguida fazer a leitura.

WHITE (89) assim interpreta a reação de Millon para proteínas:

\+ = precipitado lento fino ocre e líquido turvo — presença de formas lisas de germes

± = precipitado regular e líquido ligeiramente turvo — formas parcialmente rugosas

— = precipitado rápido grosso vermelho-rosado e líquido claro — presença de formas rugosas.

Reação do biureto: Juntar 4 cm³ (ou 5) de uma solução a 30% de hidróxido de sódio (ou de potássio) em 1 cm³ de uma suspensão densa de germes e pingar gota a gota sôbre ela uma solução de sulfato de cobre a 1% (até 10%), agitando após cada gota.

Interpretação:

+ = coloração róseo-violeta — presença de proteínas em alto teor formas lisas

± = coloração fracamente róseo-violeta — presença de proteínas em teor regular — formas parcialmente rugosas

— = coloração rósea ligeiramente violeta — presença de baixo teor de proteínas — formas rugosas.

Reações sorológicas — Usamos nêste trabalho o método de aglutinação lenta em tubos, de acôrdo com as indicações de KAUFFMANN (39).

TIPOS DE VACINAS ENSAIADAS

Partindo-se de inóculos preparados de idêntico modo, no decorrer das experimentações, vários tipos de vacinas foram preparados e submetidos a provas a fim de compará-las com a vacina obtida de culturas arejadas por borbulhamento de ar.

Foi-lhes dado um nome abreviado no texto do trabalho e assim foram obtidas:

Vacina de agar: preparo obedecendo às indicações de PENHA e D'APICE (68).

Vacina velha: preparo obedecendo a um processo de PENHA (69): a) Semeadura dos inóculos, em separado para cada amostra, em balões com meio de cultura líquido; b) Incubação durante 21 dias a 37°C. Agitação manual dos balões uma ou duas vêzes ao dia; c) Após 21 dias acrescenta-se 3 a 4°/oo de formalina (formol a 40%) e volta à estufa durante 48 horas; d) Mistura final das culturas.

Vacina borbulhada: a) semeadura dos inóculos, em separado para cada amostra, em frascos ou balões com meio de cultura líquido; b) As culturas são incubadas a 37°C e submetidas a um borbulhamento contínuo de ar atmosférico, dentro da estufa, no aparelho indicado na Fig. 1. Após várias experiências descritas nêste trabalho, o tempo de incubação foi estabilizado em 20 a 22 horas. O borbulhamento deve ser intenso, mas não exagerado; c) Acrescenta-se em cada frasco de cultura, na ocasião de ser levado à estufa, cêrca de 5 cm³ de oleo de amendoim estéril, para evitar a formação de espuma

durante o borbulhamento; d) Após o borbulhamento junta-se 3 a 4°/oo de formalina (formol a 40%) voltando à estufa durante 72 horas; e) Mistura final das culturas.

Vacina não borbulhada: — obtenção idêntica à da vacina borbulhada, substituindo-se apenas o borbulhamento de ar por agitação manual dos balões uma ou duas vêzes ao dia.

Vacina agitada: — obtenção idêntica à da vacina borbulhada, substituindo-se borbulhamento por agitação mecânica. Usa-se agitador horizontal tipo agitador de Kahn porém menos violento ou agitador magnético de rotor. Nêste ultimo tipo coloca-se dentro do frasco um pequeno bastão protegido de metal magnetizável, que é posto em movimento helicóide por meio de um imã externo preso a um motor de rotação regulável.

ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

A *Salmonella dublin* mereceu especial atenção, pois, de acôrdo com as pesquisas de PENHA e D'APICE (66) (67), confirmadas várias vêzes, inclusive por nossas verificações, é causadora mais freqüente da Enterite Infecciosa dos Bezerros no Estado de S. Paulo.

A Enterite infecciosa dos bezerros (curso, curso branco, enterite, etc.) é muito difundida, constituindo um dos principais obstáculos à criação de bovinos no Estado.

Considerando êstes fatos e o que foi dito no início de nosso trabalho, procuramos, numa série de provas experimentais, estudar o valor e as vantagens comparadas da vacina borbulhada.

Inicialmente, usando vários tipos de vacina, fizemos provas comparadas de proteção, em camondongos, procurando também verificar a influência da concentração de germes na proteção.

As vacinas foram preparadas com misturas de culturas de 5 amostras de *Salm. dublin* n.° 7357, bez. 118, 7657, 8883 e 6924 ativadas em camondongos.

Os camondongos foram divididos em grupos e sub-grupos.

As vacinas foram injetadas por via subcutânea nas doses de 0,1, 0,2 e 0,4 cm^3 (22/8/51).

As doses infectantes 0,050, 0,035 e 0,025 para a prova de proteção, foram injetadas por via intra-peritonial, inclusive nos testemunhos, 23 dias após a data da vacinação (13/9/51).

Os resultados figuram na TABELA 1.

TABELA 1

A = vacina de agar, turvação tubo 10 da Escala nefelométrica de Mc Farland.
B = vacina de agar, diluída em agua fisiológica até igualar-se a turvação da vacina velha (tubo 3 Mc Farland).
C = vacina velha, cultura em caldo Hottinger simples (tubo 3 Mc Farland).
D = vacina velha concentrada por centrifugação até apresentar turvação igual ao tubo 10 da Escala de Mc Farland.
E = vacina borbulhada, em meio de cultura Caldo Hottinger simples, borbulhamento contínuo de 48 horas (tubo 5 Mc Farland).
Dose infectante = mistura em partes iguais de culturas ativas de 5 amostras de *Salm. dublin*.
Cultura de 18 hs em Caldo Hottinger simples a 37° C.
Foram usados 324 camondongos nesta prova, divididos em grupos e sub-grupos.

		TIPOS DE VACINAS															Testemunhos
		A			B			C			D			E			
		0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	
Doses infectantes	0,050 cm³	6/4	6/6	6/4	6/5	6/3	6/3	6/2	6/6	6/2	6/2	6/0	6/3	6/2	6/2	6/0	18/18
	0,035 cm³	6/0	6/2	6/2	6/6	6/5	6/0	6/0	6/2	6/0	6/3	6/5	6/0	6/0	6/1	6/0	18/18
	0,025 cm³	6/2	6/3	6/3	6/4	6/2	6/0	6/4	6/4	6/3	6/4	6/0	6/2	6/2	6/0	6/0	18/18
	Totais	54/26			54/28			54/23			54/19			54/7			54/54
	Sobreviventes	51,8%			48,1%			57,4%			64,8%			87,0%			0%
		numerador = vacinados						denominador = mortos									

Analisando-se a TABELA 1 observa-se:

As vacinas *A* e *C* oferecem porcentagem de proteção ligeiramente favoráveis a *C* na prova em camondongos.

Nas Vacinas de Agar *A* e *B*, houve pequena variação na proteção, nas concentrações respectivas de 10 e 3 da Escala de Mc FARLAND.

Nas Vacinas velhas *C* e *D*, nas mesmas concentrações 3 e 10, a variação de proteção, embora não muito grande, foi um pouco mais significativa.

Em ambas as vacinas, o aumento de concentração de germes (mais do triplo) não trouxe um correspondente aumento de proteção. Donde se conclui que não é simplesmente a concentração de germes que condiciona a proteção maior ou menor.

Em algumas técnicas de preparo de vacina, a concentração pouco influi na proteção, todavia é possivel que por outras técnicas ou com germes diferentes possa se obter resultados mais favoráveis quando é aumentado o número de germes vacinantes por cm^3.

O poder de proteção da vacina borbulhada foi significativamente superior às outras vacinas experimentadas.

Outra verificação importante relacionou-se com o chamado "choque por endotoxinas", já muito observado nas imunizações na prática, com vacinas concentradas de suspensões de cultura em agar, dando em várias ocasiões acidentes às vêzes letais.

Para evitar, ou atenuar, êstes acidentes decorrentes da ação toxina da vacina, PENHA e D'APICE (68) vêm recomendando a vacinação da vaca em gestação, seguida da vacinação do bezerro, quando êste atinge 3 a 4 semanas de idade.

Nas partidas provadas observamos:

Vacina A: 15 a 30 minutos após a aplicação da vacina, observou-se prostação e tremores generalizados muito acentuados, em cêrca de 90% dos inoculados, morrendo 20% dêstes. Os camondongos mortos foram substituídos por outros. O "choque" nesta prova não deve ser obrigatoriamente atribuído, pelo menos no seu total de acidentes, à presença de endotoxinas, pois êste tipo de vacina é fenicado e é conhecida a sensibilidade dos camondongos ao fenol. Todavia, nas vacinações de bezerros, conforme já referimos, esta vacina causa por vêzes acidentes graves.

Vacina B: semelhante a *A*, tremores menos acentuados, sem casos letais.

Vacina C: apatia e tremores em alguns camondongos, com regressão rápida sem seqüelas.

Vacina D: semelhante a *C*, tremores leves.

Vacina E: os camondongos injetados não apresentaram qualquer perturbação apreciável.

Procurou-se verificar, em se tratando de camondongos, se a vacina de agar teria sua toxidez influenciada ou não pelo fenol, ou seja, se a toxidez da vacina de agar seria a resultante ou não da ação sinérgica da endotoxina e do fenol.

Preparados os produtos para esta prova (ver TABELA 2), foram êles injetados em camondongos por via subcutânea, nas doses de 1,0 e 1,5 cm³ (20/10/51).

Os resultados são resumidos na TABELA 2.

TABELA 2

A = vacina borbulhada, em meio de Caldo Hottinger simples, borbulhamento contínuo de 48 horas.
B = vacina de agar, turvação tubo 10 da escala de Mac Farland, em veículo glícero-fenicado.
C = vacina de agar, turvação tubo 10 da escala de Mac Farland, em veículo glícero-formolado.
D = solução glícero-fenicada usada como veículo na vacina de agar (agua fisiológica fenicada a 0,5% e glicerinada a 5%).
E = solução glícero-formolada usada como veículo na vacina de agar (agua fisiológica formolada a 0,5% e glicerinada a 5%).

Foram usados 100 camondongos nesta prova, divididos em grupos.

	Dose injetada em cm³	N.º de camondongos	Acidentes tóxicos observados: REAÇÕES GERAIS	Camondongos mortos dentro de 24 horas
Vacina A	1,5	10	Nenhuma reação local ou geral. Os camondongos, notadamente os que receberam 1,5 cm³, apresentaram apenas apatia transitoria	0
	1,0	10		0
Vacina B	1,5	10	10 minutos após a injeção, os 20 animais apresentaram fortíssima depressão, com tremores e taquipnéia muito acentuados, durando a reação cêrca de 50 minutos	4
	1,0	10		2
Vacina C	1,5	10	10 minutos após a injeção, os 20 camondongos mostraram forte depressão com tremores e taquipnéia acentuados, durando a reação cêrca de 40 minutos	2
	1,0	10		1
Solução D	1,5	10	10 minutos após a injeção, os 20 animais mostraram depressão com tremores e taquipnéia, durando a reação cêrca de 40 minutos	3
	1,0	10		1
Solução E	1,5	10	Nenhuma reação local ou geral. Os camondongos, notadamente os que receberam 1,5 cm³, apresentaram apenas apatia transitoria	0
	1,0	10		0

Observa-se:

1 — a vacina borbulhada, usada para comparação com os outros tipos de vacina, mesmo em grandes doses, não dá reações apreciáveis. A ligeira apatia observada pode ser atribuída ao grande volume de líquido em relação ao corpo do camondongo;
2 — a vacina de agar fenicada dá fortissima reação;
3 — a vacina de agar formolada dá forte reação;
4 — a solução glícero-fenicada, usada na vacina de agar, dá forte reação;
5 — a solução glícero-formolada não dá reação.

Esta prova mostrou que a cultura de *Salm. dublin* em agar é toxica e que esta toxidez, em relação ao camondongo, é aumentada quando se acrescenta fenol ao produto.

Na seguinte experiência, procuramos verificar comparativamente qual seria o tempo de borbulhamento da cultura que condicionasse a proteção mais eficiente da vacina.

As vacinas foram preparadas com mistura de culturas de 3 amostras de *Salm. dublin*, ativadas em camondongos.

As vacinas foram injetadas por via subcutânea nas doses de 0,1, 0,2 e 0,4 cm^3 (22/1/52).

As doses infectantes 0,050, 0,025 e 0,015 cm^3, para a prova de proteção, foram injetadas por via intra peritonial inclusive nos testemunhos 29 dias após a data da vacinação (20/2/52).

Os resultados figuram na TABELA 3.

Verifica-se que, nas vacinas borbulhadas, os borbulhamentos de 24, 48 e 72 hs. trazem diferenças pouco significativas na proteção. A partir do 4.º dia de borbulhamento começa a decrescer o poder protetor.

Entre as vacinas não borbulhadas, as culturas de 24 e 48 hs. dão a mesma proteção para o camondongo. O poder protetor começa a decrescer no 3.º dia em diante.

Vacinas borbulhadas de 5 dias têm poder de proteção pràticamente igual ao das Vacinas de agar de 48 hs, Vacina velha de 21 dias e Vacina não borbulhada de 3 dias.

Vacinas borbulhadas até o 3.º dia superam em poder de proteção qualquer outro tipo experimentado.

Procurando explicar o alto poder protetor das vacinas borbulhadas, verificamos logo que as culturas do germe em agar, as culturas velhas e as culturas não borbulhadas, davam suspensões parcialmente instáveis, formando depósitos mais ou menos abundantes ao fim

TABELA 3

A 1 = Vacina borbulhada cultura de 24 hs.
A 2 = Vacina borbulhada cultura de 48 hs.
A 3 = Vacina borbulhada cultura de 72 hs.
A 4 = Vacina borbulhada cultura de 96 hs.
A 5 = Vacina borbulhada cultura de 120 hs.
B 1 = Vacina não borbulhada cultura de 24 hs.
B 2 = Vacina não borbulhada cultura de 48 hs.
B 3 = Vacina não borbulhada cultura de 72 hs.
B 4 = Vacina não borbulhada cultura de 96 hs.
B 5 = Vacina não borbulhada cultura de 120 hs.
C = Vacina de agar cultura de 48 hs.
D = Vacina velha cultura de 21 dias.

Dose infectante = mistura em partes iguais de culturas ativas de 3 amostras de *Salmonella dublin*. Cultura de 18 horas em Caldo Hottinger simples a 37ºC.

Foram usados 450 camondongos nesta prova, divididos em grupos e sub-grupos.

Doses infectantes	Tipo de vacinas	A 1			A 2			A 3			A 4			A 5			C			Testemunhos
		0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	
0, 050 cm³		3/1	3/2	3/0	3/2	3/1	3/0	3/1	3/1	3/1	3/2	3/1	3/0	3/3	3/0	3/2	3/1	3/3	3/1	42/42
0,025 cm³		3/1	3/0	3/1	3/0	3/1	3/0	3/2	3/0	3/1	3/2	3/1	3/1	3/2	3/2	3/1	3/1	3/3	3/1	42/40
0,015 cm³		3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/1	3/1	3/0	3/2	3/0	3/0	3/1	3/0	3/1	42/39
	Totais	27/5			27/4			27/6			27/9			27/12			27/12			126/121
	Sobreviventes	81,4%			85,1%			77,7%			66,6%			55,5%			55,5%			3,9%

TABELA 3 (continuação)

Doses infectantes	Tipo de vacinas																	
	B 1			B 2			B 3			B 4			B 5			D		
	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³
0, 050 cm³	3/3	3/3	3/1	3/2	3/3	3/2	3/2	3/3	3/2	3/1	3/2	3/1	3/3	3/3	3/1	3/2	3/1	3/0
0,025 cm³	3/1	3/0	3/1	3/1	3/1	3/0	3/1	3/2	3/0	3/2	3/2	3/0	3/2	3/1	3/1	3/3	3/2	3/0
0,015 cm³	3/1	3/0	3/0	3/0	3/1	3/0	3/1	3/1	3/0	3/2	3/0	3/1	3/3	3/3	3/0	3/1	3/1	3/1
Totais	27/10			27/10			27/12			27/11			27/17			27/11		
Sobreviventes	62,9%			62,9%			55,5%			59,2%			37,0%			59,2%		

numerador = vacinados — denominador = mortos

de pouco tempo, enquanto que as culturas borbulhadas davam turvação uniforme e quase completa ausência de depósito por longo tempo.

Este fato pareceu, de início, estar ligado à presença de formas rugosas que, como se sabe, formam suspensões instáveis em soluções salinas.

Uma vez que, desde os trabalhos de GRINNELL (31) com uma vacina antitífica, foi verificado que as formas rugosas dão vacinas de fraco poder de proteção, seria possível relacionar o alto poder protetor da vacina borbulhada à não existência de apreciável quantidade de germes na forma rugosa.

Foram feitas pesquisas para confirmar esta hipótese.

Além das verificações diretas do aspecto da colonia, nas culturas em placa, outros processos existem recomendados por alguns autores para diferenciar os germes e as colonias nas formas lisas e rugosas:

A prova da aglutinação em placa pela tripaflavina técnica de Pampana modificada por SERTIC e BOULGAKOV; a reação de Millon, a reação de Molisch e a reação do biureto indicadas por WHITE, são as mais usadas.

Para verificar a existência ou não de formas lisas e rugosas e poder estabelecer termo de comparação, foram provados pelas reações citadas os vários típos de culturas das 3 amostras de salmonela, no meio de cultura líquido, usado para vacina.

Empregamos para a prova da tripaflavina: 10 cm^3 de cultura centrifugada a 2.800 RPM 20 minutos e ressuspensa em ½ cm^3 de meio; para as reações de Millon, Molisch e biureto: 100 cm^3 de cultura centrifugada a 2.800 RPM 20 minutos e ressuspensa em 30 cm^3 de água distilada.

As mesmas reações foram também efetuadas, partindo-se de meios sólidos. As culturas foram semeadas em placa de agar e após a incubação foram suspensas em água distilada até turvação densa. A incubação foi de 24 hs a 37°C.

Procurando verificar a percentagem de colonias rugosas, tôdas as culturas foram passadas em placa de meio de Teague e após a incubação de 24 hs a 37°C, verificada a pureza, foram escolhidas ao acaso 100 colonias para cada um dos tipos de culturas e feita a prova, de colonia por colonia, num total de 3.900, pela aglutinação pela tripaflavina.

Os resultados figuram na TABELA 4.

TABELA 4

		Cultura em meio líquido				Aglutinação de colonias pela tripaflavina			Cultura em meio sólido			
	N.º da amostra	Aglutinação pela triplaflavina	Reação de Molisch	Reação de Millon	Reação do biureto	N.º de colonias testadas	fracamente positivas	positivas	Aglutinação pela triplaflavina	Reação de Molisch	Reação de Millon	Reação do biureto
inóculo	7375	+				100	2	2		+	±	+
	7657	+				100	6	0		+	±	+
	8883	+				100	4	2		+	—	+
cultura borbulhada A 1	7375	—	+	±	+	100	2	0	—	+	+	+
	7657	—	+	+	+	100	1	2	—	+	+	+
	8883	—	+	+	+	100	6	3	—	+	+	+
A 2	7375	—	±	+	+	100	1	0	—	+	±	+
	7657	—	±	+	+	100	0	1	—	+	±	+
	8883	—	±	+	+	100	0	2	—	+	+	+
A 3	7375	—	±	±	+	100	1	4	—	+	+	+
	7657	—	±	+	+	100	1	0	—	+	+	+
	8883	—	±	±	+	100	3	2	—	+	±	+
A 4	7375	—	—	±	±	100	5	3	—	+	+	+
	7657	—	±	±	±	100	4	3	—	+	+	+
	8883	—	±	±	±	100	1	1	—	+	±	+
A 5	7375	—	—	±	±	100	19	26	+	+	±	+
	7657	±	±	±	±	100	13	44	—	±	±	+
	8883	—	±	±	±	100	16	38	—	+	±	+
cultura não borbulhada B 1	7375	±	—	—	+	100	1	2	+	±	±	±
	7657	—	±	±	+	100	6	0	+	±	±	+
	8883	+	±	—	+	100	8	4	+	±	—	+
B 2	7375	+	±	±	+	100	11	24	+	+	—	+
	7657	—	±	±	+	100	10	26	+	+	+	+
	8883	+	+	±	+	100	15	20	+	+	—	+
B 3	7375	+	±	—	+	100	6	8	+	+	±	+
	7657	+	±	—	+	100	20	25	+	±	±	±
	8883	+	±	—	+	100	9	6	+	±	+	+
B 4	7375	+	—	±	±	100	22	15	+	±	±	+
	7657	+	—	±	±	100	22	20	+	±	±	+
	8883	+	±	±	±	100	26	26	+	±	±	+
B 5	7375	+	—	—	±	100	17	34	+	—	±	+
	7657	+	—	—	±	100	17	33	+	±	±	+
	8883	+	±	—	±	100	15	51	+	±	±	+
cultura em agar C	7375					100	3	1	+	+	—	+
	7657					100	3	9	+	+	±	+
	8883					100	5	2	+	+	—	+
cultura velha D	7375	+	±	—	±	100	5	5	±	±	—	+
	7657	+	—	—	±	100	4	15	+	±	—	+
	8883	+	±	—	±	100	0	0	±	±	—	+

A pequena percentagem de formas rugosas nas culturas borbulhadas em relação às não borbulhadas possivelmente está ligada às observações de ALLEN e EDEN (3), de que o borbulhamento de ar tende a tornar o meio alcalino por eliminar ou diminuir em certos casos o teor de ácidos voláteis que se formam durante o desenvolvimento do germe; por outro lado, modifica o metabolismo do germe devido a uma maior oxigenação do substrato.

Observa-se também que o tempo de incubação da cultura influi no aparecimento de formas rugosas. Nas culturas borbulhadas, o aumento de número das formas rugosas foi lento em relação ao tempo de incubação e em comparação com as culturas não borbulhadas.

Pela sua relativa dificuldade em passar à forma rugosa em comparação às demais amostras, pareceu-nos ser muito interessante a amostra 7657. Acresce ainda o fato de que o exame microscópico das amostras indicou que a cultura da amostra 7657 apresenta aspecto mais uniforme que as demais.

Por isso, achamos interessante, nas experiências seguintes, fazer vacina borbulhada, só com a amostra 7657 e experimentar seu poder de proteção contra dose infectante de várias amostras.

Examinamos também a turvação, pH, e motilidade das várias culturas, figurando êstes exames na TABELA 5.

Nesta tabela observa-se:

a — a turvação das vacinas borbulhadas é maior que as demais;

b — o pH das vacinas borbulhadas é mais alcalino;

c — a motilidade do germe, medindo cada 24 hs. em cm no tubo U com agar semi-sólido de JORDAN, mostra que nas culturas borbulhadas o germe diminui sua motilidade em relação às não borbulhadas.

DAGLEY e DAVIS (17) observaram que a cultura arejada do *Aerobacter aerogenes*, em meio sal glicose — amônio é de pH mais alcalino que quando não arejada. Julgam que a aeração permite o recôbro do crescimento, porquanto o oxigênio torna-se aceptor do hidrogênio da cozimase reduzida (quando esta cessa a ação sôbre os metabólitos no meio desprovido de oxigênio), e re-oxida-a. Embora o pH e o acúmulo de produtos metabólicos pareçam afetar êste processo, os efeitos do oxigênio não podem ser atribuídos unicamente a fato de provocar a reversão dêstes fatores.

TABELA 5

Tipo de cultura	*Salm. dublin* amostra n.º	Turvação escala de MacFarland tubo n.º	pH da cultura pH inicial 7,3	Motilidade: deslocamento medido em centímetros no tubo U 24 hs.		48 hs.	
inóculo	7375	—	—	10,0	10,6	20,0	20,0
	7657	—	—	12,5		20,0	
	8883	—	—	9,5		20,0	
cultura borbulhada A 1	7375	3	8,2	12,5	9,83	20,0	19,63
	7657	3	8,2	9,0		19,5	
	8883	3	8,4	8,0		19,4	
cultura borbulhada A 2	7375	5	8,6	8,5	8,0	20,0	19,43
	7657	5	8,4	9,0		19,7	
	8883	5	8,6	6,5		18,6	
cultura borbulhada A 3	7375	5	9,1	8,5	7,83	20,0	18,96
	7657	5	8,6	8,5		19,0	
	8883	5	9,1	6,5		17,9	
cultura borbulhada A 4	7375	6	9,0	8,5	7,4	20,0	18,56
	7657	6	9,0	7,7		18,7	
	8883	6	9,0	6,0		17,0	
cultura borbulhada A 5	7375	6	9,1	10,5	8,83	20,0	19,33
	7657	6	8,7	9,5		20,0	
	8883	6	9,1	6,5		18,0	
cultura não borbulhada B 1	7375	2	7,4	12,0	11,0	20,0	20,0
	7657	2	7,4	12,0		20,0	
	8883	2	7,6	9,0		20,0	
cultura não borbulhada B 2	7375	4	8,0	10,5	10,66	20,0	19,83
	7657	3	7,9	11,0		20,0	
	8883	4	8,0	10,5		19,5	
cultura não borbulhada B 3	7375	4	8,1	11,0	10,33	20,0	19,9
	7657	4	8,1	10,0		19,7	
	8883	4	8,1	10,0		20,0	
cultura não borbulhada B 4	7375	5	8,2	10,5	10,03	20,0	19,9
	7657	5	8,2	10,8		20,0	
	8883	5	8,2	8,8		19,7	
cultura não borbulhada B 5	7375	4	8,3	10,0	9,56	20,0	19,83
	7657	4	8,2	10,5		20,0	
	8883	4	8,1	8,2		19,5	
cultura em agar C	7375	—	—	12,3	12,5	20,0	20,0
	7657	—	—	12,7		20,0	
	8883	—	—	12,5		20,0	
cultura velha D	7375	—	8,8	7,1	7,3	18,6	18,13
	7657	—	8,8	7,7		18,8	
	8883	—	8,8	7,1		17,0	

As verificações por nós efetuadas mostram que, partindo de um mesmo inóculo e de um caldo HOTTINGER fracamente tamponado, pH inicial 7,3 ao fim de 24 hs. a 37°C, os resultados são: TABELA 5.

para culturas não borbulhadas — pH médio 7,5
para culturas borbulhadas — pH médio 8,2.

A motilidade, aliada ao exame do aspecto microscópico do germe, fornecem interessante contribuição para esclarecimento do maior poder protetor das culturas borbulhadas.

No microscópio, observa-se que os germes das culturas borbulhadas são mais grossos, um pouco maiores, têm predomínio de formas isoladas e têm aspecto mais uniforme que os das culturas não borbulhadas.

Sabe-se, de acôrdo com vários pesquisadores que os antígenos somáticos (0) se localizam no corpo bacteriano e os antígenos flagelares (H) se encontram nos cílios.

Nas culturas borbulhadas, como já dissemos, o corpo do germe é mais grosso e maior, podendo-se supor que deva ter mais antígeno somático. Nestas culturas, o germe é menos móvel, portanto é de supor também que deva ter menos antígeno flagelar. Sabe-se que o antígeno somático é o responsável pela imunidade; assim sendo, é de presumir que a confirmação destas observações possam explicar porque as vacinas de culturas borbulhadas protegem melhor.

Em todas as experiências anteriores, as vacinas procedentes de culturas em meio líquido foram obtidas usando-se o caldo HOTTINGER simples.

Positivado o valor das culturas borbulhadas na obtenção de vacinas, resolvemos estudar a questão relativa à obtenção de um meio de cultura que fosse melhor que o caldo HOTTINGER simples.

Usando uma só amostra de *Salm. dublin* n.º 7657, preparamos diversas culturas borbulhadas e não borbulhadas, empregando como meio de cultura diversas variantes, tendo como base o caldo HOTTINGER. As culturas mostraram nos exames de laboratório os seguintes resultados, condensados na TABELA 6.

O exame da tabela mostra que a cultura tipo A 5 foi a que melhor se apresentou. Embora tendo menos turvação que a cultura tipo A 6, após 24 horas de cultura tem maior número de germes vivos na contagem em placa. Tem relativamente pequena percentagem de formas rugosas.

A cultura tipo A 5, com borbulhamento de 24 hs, embora tenha menos turvação que borbulhada durante 48 hs tem mais ger-

TABELA 6

A 1 = cultura borbulhada usando-se o caldo Hottinger simples como meio de cultura e dois tempos de borbulhamento 24 e 48 horas.
A 2 = idêntica a A 1 usando-se como meio de cultura caldo Hottinger tamponado.
A 3 = idêntica a A 1 usando-se caldo Hottinger glicosado simples.
A 4 = idêntica a A 1 empregando-se caldo Hottinger glicosado tamponado.
A 5 = idêntica a A 1 utilizando-se de caldo Hottinger levedo fresco glicosado simples.
A 6 = idêntica a A 1 usando-se caldo Hottinger levedo fresco glicosado tamponado.
A 7 = idêntica a A 1 usando-se caldo Hottinger levedo simples.
N 1, N 2, N 3, N 4, N 5, N 6 e N 7 = idênticas respectivamente às culturas A1, A 2, A 3, A 4, A 5, A 6 e A 7 diferindo apenas no fato de não serem borbulhadas.

		Turvação Escala de McFarland Tubo n.º		pH da cultura inicial 7, 2		Contagem de colonias em placa N.º de germes por cm³ (em milhões)		Aglutinação de colonias pela tripaflavina					
								cultura de 24 hs.			cultura de 48 hs.		
		Cultura de 24 hs.	Cultura de 48 hs.	Cultura de 24 hs.	Cultura de 48 hs.	cultura de 24 hs.	cultura de 48 hs.	N.º de colonias testadas	Fracamente positivas	Positivas	N.º de colonias testadas	Fracamente positivas	Positivas
Culturas borbulhadas	A 1	7	8	8,2	8,4	3.260	—	100	5	6	100	5	7
	A 2	2×6	10	8,0	8,4	3.400	500	100	6	9	100	5	12
	A 3	7	8	7,8	8,3	12.500	2.760	100	8	12	100	5	2
	A 4	2×6	10	7,6	8,3	1.250	1.000	100	4	7	100	3	11
	A 5	2×6	3×7	7,8	8,4	17.500	5.300	100	3	10	100	5	3
	A 6	3×7	2×8	7,8	8,4	3.300	2.300	100	6	10	100	0	7
	A 7	6	2×9	7,2	8,2	2.300	3.600	100	10	12	100	3	7
Culturas não borbulhadas	N 1	4	5	7,6	8,0	1.450	500	100	8	24	100	8	66
	N 2	5	5	7,4	7,6	2.500	—	100	7	19	100	7	53
	N 3	4	4	7,2	7,6	5.000	500	100	4	30	100	3	24
	N 4	3	5	7,1	7,3	550	200	100	11	48	100	3	35
	N 5	5	9	7,0	7,2	900	950	100	8	15	100	11	16
	N 6	5	7	7,0	7,3	550	800	100	7	14	100	11	31
	N 7	5	8	7,0	7,5	800	1.000	100	10	28	100	11	19

mes vivos; assim sendo, o meio de cultura usado na produção da Vacina chamada A 5-24 é o que melhores resultados apresenta aos exames de laboratório.

Todavia, uma vez que as vacinas A 5-24, A 5-48, A 6-24 e A 6-48 obtidas das culturas A 5 e A 6 borbulhadas durante 24 e 48 hs apresentaram boas características; foram todas elas submetidas à prova de proteção em camondongos, juntamente com as vacinas N 5-24, N 5-48, N 6-24 e N 6-48, usadas para comparação.

As vacinas foram injetadas por via subcutânea (1/4/53) e a dose infectante (17/4/53) por via intraperitonial.

Anote-se que, nesta prova, as vacinas preparadas com uma só amostra de *Salm. dublin* foram provadas contra mistura de culturas ativas de 5 amostras da mesma espécie de *Salmonella*.

O resultado figura na TABELA 7.

O exame da tabela confirma as verificações de laboratório, pois verifica-se melhor proteção com a Vacina A 5-24 seguida da A 6-24.

O caldo HOTTINGER com levedo fresco simples, é, conforme se observa nesta prova, excelente meio de cultura.

Verificada a possibilidade de se obter um meio de cultura melhor que o caldo HOTTINGER simples e verificado o excelente resultado obtido com a água de levedo fresco, repetimos algumas vêzes a vacina, usando o caldo HOTTINGER levedo fresco simples.

A água de levedo fresco, para confecção do meio de cultura, era obtida partindo-se de levedo fresco de cerveja, obtido de uma das cervejarias da cidade de São Paulo.

Esta cervejaria dispõe de vários tipos de levedo usados no preparo de várias marcas de cerveja, denominadas de alta e de baixa fermentação.

O levedo obtido para o preparo do meio de cultura variava muito de tipo, dependendo da marca de cerveja que se estava preparando na ocasião do pedido e chegou-se à conclusão que melhores resultados são obtidos com os levedos chamados de baixa fermentação.

Todavia, verificado a pouca possibilidade prática de se obter levedos uniformes e não sendo conveniente manter o levedo em culturas no laboratório, embora os resultados com levedo fresco fossem bons, ensaiamos outros meios de cultura que possibilitassem obtenção de partidas de produtos com turvação mais uniforme.

A TABELA 8 mostra os resultados obtidos com alguns meios de cultura empregados.

Os resultados indicam a possibilidade de se obter meios de culturas tão bons quanto os que empregam levedo fresco.

Todavia, alguns dos meios ensaiados são complexos e trabalhosos e embora tenham dado bons resultados, não mereceram aprovação prática. Teriam valor se seus resultados fossem muito superiores aos demais, compensando dêste modo os trabalhos de preparo.

O "corn-steep" (água de milho) é uma substância que se encontra pronta no comércio sob forma de concentrado líquido. Seu uso em meios de cultura foi já indicado por vários autores (45) (46) (10). Os ensaios com *Salm. dublin* não mostraram que o "corn-steep" fôsse superior aos outros meios; além disso, o prepa-

TABELA 7

A 5 = vacina borbulhada usando-se caldo Hottinger levedo fresco glicosado simples como meio de cultura e dois tempos de borbulhamento 24 e 48 horas denominando-se respectivamente as vacinas A 5 — 24 e A 5 — 48
A 6 = idêntica a A 5 usando-se como meio de cultura caldo Hottinger levedo fresco glicosado tamponado.
N 5 e N 6 = idênticas respectivamente às vacinas A 5 e A 6 diferindo apenas no fato de não serem borbulhadas.
Dose infectante — mistura em partes iguais de culturas ativas de 5 amostras de *Salm. dublin.* Culturas de 20 hs. em Caldo Hottinger simples a 37°C.
Foram usados 276 camondongos nesta prova, divididos em grupos e sub-grupos.

Dose infectante	TIPOS DE VACINAS	A 5 — 24			A 5 — 48			A 6 — 24			A 6 — 48			N 5 — 24			N 5 — 48			N 6 — 24			N 6 — 48			Testemunhos
		0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	
0,050 cm³		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	20
		1	0	0	1	3	0	1	1	1	3	1	0	2	1	3	3	3	2	3	2	2	3	1	2	20
0,025 cm³		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	20
		0	1	1	1	0	2	0	1	1	3	0	1	1	2	1	2	2	0	3	3	2	3	3	2	20
0,015 cm³		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	20
		1	0	0	1	1	2	1	0	0	2	1	1	3	3	3	2	2	1	3	3	3	2	3	2	20
Totais		27/4			27/11			27/6			27/12			27/19			27/17			27/24			27/21			60/60
Sobreviventes		85,1%			59,2%			77,7%			55,5%			29,6%			37,0%			11,1%			22,2%			0%

numerador = vacinados — denominador = mortos

TABELA 8

		N.º de ordem do frasco	Meio de cultura	Turvação Escala de Mc Farland	pH inicial 7,2	Contagem em placa (em milhões)
obtida 24/6/52	borbulhado	1	Caldo Hottinger + dialisado de fígado + glicose + tampão	8	6,6	
		2	Caldo Hottinger + dialisado de fígado + glicose + tampão + levedo seco	9	6,8	2.500
	não borbulhado	3	Igual ao do frasco n.º 1	3	6,2	
		4	Igual ao do frasco n.º 2	5	6,2	140
obtida 4/7/52	borbulhado	5	Caldo Extrato de carne + dialisado de fígado + glicose + levedo seco + sangue hemolisado + peptonas	9	7,2	1.990
	não borbulhado	6	Igual ao do frasco n.º 5	3	6,2	95
obtida 3/9/52	borbulhado	7	Caldo Hottinger + levedo Fleischmann + glicose	7	6,1	
		8	Caldo Hottinger + 0,5% corn-steep	6		
		9	Caldo Hottinger + 1% corn-steep	6		
		10	Caldo Hottinger + 1,5% corn-steep	7		
		11	Caldo Hottinger + 2% corn-steep	6		
		12	Caldo Hottinger + 2,5% corn-steep	6		
		13	Caldo Hottinger + 3% corn-steep	6		
		14	Igual ao do frasco n.º 7 + 25 mg Vit. B 1	10	6,2	
		15	Igual ao do frasco n.º 7 + 50 mg Vit. B 1	8	6,1	
	não borbulhado	16 a 24	Meios de cultura respectivamente idênticos aos dos frascos n.º 7 a 15	média 4 a 5	médio 6,2	

rado com o qual foram feitos os ensaios dava um depósito de pequeninas lamelas escuras, tornando a apresentação da vacina inadequada sob o ponto de vista comercial.

O levedo Fleischmann encontra-se no comércio, sob forma úmida, em tabletes ou pacotes, apresentando-se em lotes pràticamente uniformes no seu preparo. Foi também ensaiada a Vitamina B 1 considerada por LEDEBERG (43) como fator necessário ao crescimento da *Salmonella dublin*.

Das vacinas obtidas, aquela que aos exames de laboratório pareceu melhor corresponder ao que se deseja foi preparada com caldo Hottinger + água de levedo Fleischmann + glicose + Vitamina B 1.

A proporção de Vitamina B 1 não precisa ser grande. Nas experiências que vêm citadas a seguir, passamos a empregar vacinas preparadas com o meio de cultura mencionado, acrescido de 15 mg de Vitamina B 1 por litro.

Cumpre acrescentar que a Vitamina B 1 não é indispensável, porquanto o meio de cultura já é suficientemente rico em elementos nutritivos. Todavia como parece ela exercer certa ação favorável aumentando ligeiramente o crescimento, é interessante que seja incorporada ao meio.

Estabilizada a questão do meio de cultura, resolvemos comparar a cultura borbulhada com outros tipos de arejamento, usando a vacina não borbulhada como referência.

A TABELA 9 resume as verificações.

TABELA 9

TIPO DE CULTURA	pH inicial 7,2	Turvação Escala de Mc Farland	Contagem do n.º de germes por cm³ em placa (em milhões)	Aglutinação de colonias pela Triplavina		
				N.º de colonias testadas	fracamente positivas	positivas
Cultura borbulhada	6,6	9	9.766	100	16	4
Cultura agitada (agitador com movimento de vai e vem)	6,1	8	3.863	100	22	14
Cultura agitada (agitador magnético de rotor)	6,3	8	4.220	100	18	14
Cultura não borbulhada	6,0	5	3.440	100	37	15

O exame da tabela mostra, evidentemente, que a cultura borbulhada supera as demais em valor para preparo de vacina.

CONCLUSÕES

1 — Os AA. verificam, no decorrer de seus trabalhos, que é possível obter excelente vacina contra infecções por *Salm. dublin,* pela técnica de semeadura dos germes em meios de cultura líquidos, submetidos a borbulhamento contínuo de ar atmosférico.

2 — A vacina obtida, quando inoculada em camondongos, mostrou alto poder de proteção e quasi completa ausência de acidentes tóxicos por endotoxinas.

3 — Vacinas obtidas por outras técnicas submetidas a idênticas provas, revelaram menor poder de proteção e relativa freqüência de acidentes tóxicos nos animais inoculados.

4 — A possível explicação do alto poder protetor da vacina borbulhada reside provavelmente em fatores observados com relação ao germe.

5 — O não aparecimento de acidentes tóxicos leva os autores a admitir a não existência de endotoxinas livres ou a uma transformação da endotoxina liberada em conseqüência do borbulhamento de ar.

6 — Foram ensaiados 18 tipos de meios de cultura a fim de se escolher aquele que oferecesse melhores condições práticas de trabalho.
A técnica de borbulhamento e o meio de cultura, por sua características, permitem fácil obtenção em alta escala da vacina ensaiada nêste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Os AA. agradecem a colaboração gentilmente prestada, na execução dêste trabalho, de Dna. Henriqueta Campos, nas provas de aglutinação em tubos e em placa; do Dr. Washington D. O. Beleza, nas pesquisas bibliográficas; do Sr. Brasilio Seraphim de Oliveira Jr., nos trabalhos e sugestões para o preparo dos meios de cultura; e do Dr. Paulo de Mello Freire, na versão do resumo para o inglês.

OBSERVAÇÕES

Um *Nota Prévia* dêste trabalho foi apresentada à VII Reunião Anual de Medicina Veterinária, sob os auspícios da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, São Paulo, Brasil, em 15 de Dezembro de 1951.

BUBBLING TECHNIQUE IN THE PREPARATION OF VACCINES I — STUDIES ON VACCINES AGAINST *SALMONELLA DUBLIN* INFECTIONS

Abstract

Very effective vaccine against Salmonella dublin infections in animals can be obtained after growing this organism in liquid culture media through which a continuous bubbling of filtered air is forced.

Eighteen different culture media were tested in the proccess of selecting the best adapted to the production of these vaccines.

The different batches of vaccines tried showed a high immunizing power with no accidents due to bacterial endotoxins, in the laboratory tests.

The technique used for vaccine preparation, namely the specified culture medium and the bubbling proccess are most favourable for the large-scale production of the vaccine considered in this study.

BIBLIOGRAFIA

1) Alessandrini, A. e Sabatucci, M. 1931 — La tripaflavina quale mezzo di differenzazione dei microbi del genere *Brucella*. *Annali d'igiene*, Roma, **41** (1): 29-34.

2) Alessandrini, A. e Sabatucci, M. — 1931 — A proposito della reazione di agglutinazione aspecifica alla tripaflavina. *Annali d'Igiene, Roma*, **41** (12): 852-855.

3) Allen, L. A. and Eden, G. E. — 1946 — Effect of continuous aeration on bacterial oxidation of organic matter. *Jour. of Hyg.*, Cambridge, **44** (6): 508-517.

4) Arkwright, J. A. — 1927 — The value of different kinds of antigen in prophylactic "enteric vaccines". *Jour. of Path. and Bact.*, **30** (2): 345-364.

5) Basset, J. et Paille, R. — 1930 — Préparation de la Toxine destinée à la vaccination contre le Charbon Symptomatique, Toxine pure et Toxine formolée. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **103**: 250-251.

6) Becze, G. de and Liebmann, A. J. — 1944 — Aeration in the production of compressed yeast. *Ind. and Eng. Chem.*, **36** (10): 882-890.

7) Bier, O. e Planet, N. — 1937 — Influencia da agitação sobre o desenvolvimento das culturas bacterianas. *Arch. Inst. Biológico*, São Paulo, 8 (5): 107-114.

8) Bier, O. — 1953 — Bacteriologia e Imunologia, em suas aplicações à Medicina e à Higiene. 6.ª Edição. Comp. Melhoramentos de São Paulo, Brasil.

9) Brockmann, M. C. and Stier, T. J. B. — 1947 — The influence of oxygen on the formation of glycerol during alcoholic fermentation. (Scient. Proceedings. 47.º Gen. Meet. of The Soc. of Amer. Bacteriologists) *Jour. of Bact.* **54** (1): 23-24.

10) Carvalho da Silva, N. e Oliveira Vernet, R. de — 1950 — Problemas da cultura do *H. pertussis* para fins industriais. Trabalho apresentado ao 5.º Congresso Internacional de Microbiologia. Rio de Janeiro, 17-24 de Agosto de 1950.

11) Chain, E. B., Paladino, S., Callow, D. S., Ugolini, F. and Van Der Sluis, J. — 1952 — Studies on Aeration — I. First International Symposium on Chemical Microbiology. *World Health Organization, Monograph Series* Nr. 10, pp. 73-97.

12) Chang, Shig Lu — 1947 — Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae.* I. Two new mediums for growing *L. icterohaemorrhagiae, L. canicola* and *L. biflexor,* and a method for maintaining the virulence of *L. icterohaemorrhagiae* in culture. *The Jour. of Infect. Dis.,* **81** (1): 28-34.

13) Chang, Shi Lu — 1947 — Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae.* III. The growth rate of, and some biochemical observations on *Leptospira icterohaemorrhagiae* in culture. *The Jour. of Infect. Dis.,* **81** (1): 35-47.

14) Cordier — 1926 — *Compt. Rend. Soc. Biol.,* 95: 848-850 cit. in Rodrigues, C. 1945.

15) Crossley, V. M., Ferguson, M. and Brydson, L. — 1946 — The use of soluble starch medium in the preparation of smooth "O" *Salmonella* antigens. *Jour. of Bact.,* **52** (3): 367-371.

16) Dagley, S., Dawes, E. A. and Morrison, G. A. — 1951 — The effect of aeration on the growth of *Aerobacter aerogenes* and *Escherichia coli,* with reference to the Pasteur mechanism. *Jour. of Bact.,* **61** (4): 433-441.

17) Dagley, S., Dawes, E. A. and Morrison, G. A. — 1952 — Effect of aeration of pH values of bacterial cultures. *Jour. of Bact.,* **64** (5): 768-769.

18) Daniels, H. S. and Stahly, G. L. — 1946 — The effect of aeration on amylase production by *Bacillus macerans. Jour. of Bact.,* **52** (3): 351-352.

19) De Villiers, J. J. — 1937 — *S. Afr. Med. J.* 11: 221 cit. in Grasset, E. 1939.

20) Felix, A. — 1951 — The preparation, testing and standardization of typhoid vaccine. *Jour. of Hyg.,* Cambridge, **49** (2 e 3): 268-287.

21) Feustel, I. C. and Humfeld, H. — 1946 — A new laboratory fermenter for yeast production investigations. *Jour. of Bact.,* **52** (2): 229-235.

22) Fostder, J. W., Daniel, M. C., Woodruff, H. B. and Stokes, J. L. — 1945 — Microbiological aspects of Penicillin V. Conidiospore formation in submerged cultures of *Penicillium notatum. Jour. of Bact.,* **50** (3): 365-368.

23) Fraser, D. — 1951 — An apparatus for the growth of aerobic bacteria and the preparation of bacteriophage. *Jour. of Bact.,* **61** (2): 115-119.

24) Gee, L. L. and Gerhardt, P. — 1946 — *Brucella suis* in aerated broth culture. II. Aeration studies. *Jour. of Bact.,* **52** (3): 271-281.

25) Gerhardt, P. and Gee, L. L. — 1946 — *Brucella suis* in aerated broth culture. I. Preliminary studies on growth assays, inoculum, and growth characteristics in an improved medium. *Jour. of Bact.,* **52** (3): 261-269.

26) Gerhardt, P. — 1946 — Brucella suis in aerated broth culture. III. Continuous culture studies. *Jour. of Bact.,* **52** (3): 283-292.

27) Gladstone, G. P., Fildes, P. and Richardson, G. M. — 1935 — Carbon dioxide as an essential factor in the growth of bacteria. *Brit. Jour. of Exp. Pathol.* **16** (3): 335-348.

28) Glassman, H. N. and Elberg, S. — 1946 — The growth of *Brucella* in aerated liquid cultures. *Jour. of Bact.*, **52** (4): 423-430.

29) Grasset, E., Zoutendyk, A. and Schaafsma, A. — 1935 — *Bact. aertrycke* endotoxin: a study on its production, detoxication and the practical utilization of its antigenic properties. *Brit. Jour. Exp. Pathol.* **16** (5): 454-460.

30) Grasset, E. — 1939. — Typhoid Endotoxoid Vaccine. A review of the results of preventive inoculation in an inoculated population of 400,000. *Brit. Med. Jour.*, (July 8): 58-61.

31) Grinnell, F. B. — 1932 — A study of the dissociation of the Rawlins Strain of *Bacterium typhosum* with special reference to its use in the production of anti-typhoid vaccine. *Jour. of Exp. Med.* **56**: 907-918.

32) Heatley, N. G. and Florey, H. W. — 1946 — An antibiotic from *Bacterium coli*. *Brit. Jour. of Exp. Pathol.*, **27** (6): 378-390.

33) Hirsch, W. — 1937 — The agglutinability by trypaflavine of *B. typhosus* and its relation to the Vi antigen. *Jour. of Pathol. and Bact.*, **44** (2), 349-355.

34) Huddleson, I. F. — 1943 — Brucellosis in man and animals. Revised Edition 379 pg. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.

35) Humfeld, H. — 1947 — An improved laboratory-scale fermentor for submerged culture investigations. *Jour. of Bact.*, **54** (6): 689-696.

36) Kantorowicz, O. — 1951 — Shaking apparatus for the aeration of bacterial cultures. *Jour. Gen. Microbiol.*, **5** (2): 276-278.

37) Karow, E. O. — 1947 — Factors affecting the production of citric acid in submerged cultures. (Scient. Proceedings, 47° Gen. Meet. of the Soc. of Amer. Bacteriologists) *Jour. of Bact.*, **54** (1): 41.

38) Karow, E. O. and Waksman, S. A. — 1947 — Production of Citric Acid in submerged culture. *Ind. and Eng. Chem.*, **39** (7): 821-825.

39) Kauffmann, F. 1951 — Enterobacteriaceae 338 pg. Ejnar Munksgaard Publisher, Copenhagen.

40) Kligler, I. J. — 1919 — Yeast autolysate as a culture medium for bacteria. *Jour. of Bact.*, **4** (2): 183-188.

41) Koffler, H., Emerson, R. L., Perlman, D. and Burris, R. H. — 1945 — Chemical changes in submerged penicillin fermentations. *Jour. of Bact.*, **50** (5): 517-548.

42) Koffler, H. Knight, S. G., Emerson, R. L. and Burris, R. H. — 1945 — The effect of certain chemicals on penicillin production and mold metabolism in shake flask fermentations. *Jour. of Bact.*, **50** (5): 549-559.

43) Lederberg, J. — 1947 — The nutrition of *Salmonella*. *Archives of Biochemistry* **13** (2): 287-290.

44) Liener, I. E. and Buchanan, D. L. — 1951 — The fixation of carbon dioxide by growing and nongrowing yeast. *Jour. of Bact.*, **61** (5): 527-534.

45) Liggett, R. W. — 1946 — The use of corn steeping liquor in microbiological research. *Jour. of Bact.*, **51** (5): 597.

46) Liggett, R. W. and Koffler, H. — 1948 — Corn steep liquor in microbiology. *Bacteriological Reviews*, 12 (4): 297-311.

47) Loureiro, J. A. M. de — 1946 — Aerobise forçada. I. Um aerador asséptico para culturas líquidas em profundidade de microrganismos aeróbios. *Cadernos Científicos*, Lisboa, 1 (1): 22-44.

48) Loureiro, J. A. M. de, e Rodrigues, I. — 1946 — Culturas em meio líquido para a preparação de Vacina anti-pertussis. *Cadernos Científicos*, Lisboa, 1 (1): 45-64.

49) Luippold, G. F. — 1945 — *Amer. Jour. Publ. Health* 35: 153 in Zinsser's Textbook of Bacteriology. Ninth Edition, 992 pp., 1948. Appleton-Century-Crofts, Inc., New York, pg. 469.

50) McLeod, J. W. and Gordon, J. — 1923 — The problem of intolerance of oxygen by anaerobic bacteria. *Jour. of Pathol, and Bact.*, 26 (3): 332-343.

51) Magoon, C. A. and Brunstetter, B. C. — 1930 — A new vessel for the efficient aeration of bacterial cultures in liquid media. *Jour. of Bact.*, 19 (6): 415-422.

52) Málek, I. — 1950 — Mnození E. coli v proudícím prostedí (Multiplication of *Escherichia coli* in flowing media). *Biol. Listy, Prague*, 31 (8): 93-95 in *Biol. Abstr.* 1951, 25 (4): 1006 art. 11.389.

53) Mason e Scheuber — 1936 — *The Onderstep. Jour.*, 7: 143-165 cit. in Rodrigues, C. 1945.

54) Mense, E. H. le, Corman, J., Van Lanen, J. M. and Langlykle, A. F. — 1947 — Production of mold amylases in submerged culture. *Jour. of Bact.*, 54 (2): 149-159.

55) Meyerstein, R. 1938 — *S. Afr. Med. J.*, 12: 324 cit. in Grasset, E. 1939.

56) Miller, W. R., Pannell, L., Cravits, L., Tanner, W. A. and Ingalis, M. S. 1948 — Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei*. I. Morphology, cultivation, viability, and isolation from contamined specimens. *Jour. of Bact.*, 55 (1): 115-126.

57) Mishulow, L. assisted by Sharpe, L. S. and Cohen, L. L. 1952. Mucin solution for enhancing the virulence of *S. typhi. Jour. Lab. and Clind Med.*, 89 (3): 503-504.

58) Neill, J. M., Sugg, J. Y., Richardson, L. V. and Fleming, W. L. — 1929 — The use of culture media made from commercial dried yeast as a routine substitute for meat infusion peptone media. *Jour. of Bact.*, 17 (5): 329-337.

59) Nolte, A. J., Von Loesecke, H. W. and Pulley, G. N. — 1942 — Feed yeast and industrial alcohol from citrus-waste press juice. *Ind. and Eng. Chem.*, 34 (6): 670-673.

60) Nungester, W. J., Wolf, A. A. and Jourdonais, L. F. — 1932 — Effect of gastric mucin on virulence of bacteria in intraperitoneal injections in the mouse. *Proc. of the Soc. Exp. Biol. and Med.*, 30 (2): 120-121.

61) Olitzki, L., Shelubsky, M. and Hestrin, S. — 1946 — Pathogenizing effect of different carbohydrates on *Eberthella typhosa*. *Proceed of the Soc. Exp. Biol. and Med.*, New York, 63 (3): 491-496.

62) Olitzki L. — 1948 — Mucin as a resistance-lowering substance. *Bacteriological Reviews*, 12 (2): 149-172.

63) Pampana, E. J. — 1931 — La dissociazione microbica e la tripaflavina come suo reattivo. *Annali d'Igiene*, Roma, 41 (8): 537-553.

64) Pampana, E. J. — 1933 — Microbic dissociation, detection of the "R" variant by means of a specific drop-agglutination. *Jour. of Hyg.*, 33 (3): 402-403.

65) Pavcek, P. L., Peterson, W. H. and Elvehjem, C. A. — 1937 — Effect of growth conditions on yield and vitamin B 1 of yeast. *Ind. Eng. Chem.*, 29 (6): 536-541.

66) Penha, A. M. e D'Apice, M. — 1944 — Observações sobre a Enterite infectuosa dos bezerros. Etiologia e vacinação. *Bol. Soc. Paulista Med. Vet.*, 6 (2): 154-160.

67) Penha, A. M. e D'Apice, M. — 1946 — Contribuição ao estudo da Enterite infecciosa dos bezerros. I. Importancia da *Salmonella dublin* na etiologia dessa moléstia em São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 17 (15): 239-248.

68) Penha, A. M. e D'Apice, M. — 1950 — Contribuição ao estudo da Enterite infecciosa dos bezerros. II. Experiencias de vacinação e mecanismo de transmissão da imunidade da vaca ao bezerro. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 19 (19): 309-324.

69) Penha, A. M. — 1951 — Comunicação verbal.

70) Peterson, W. H., Snell, J. F. and Frazier, W. C. — 1945 — Fodder yeast from wood Sugar. *Ind. and Eng. Chem.*, 37 (1): 30-35.

71) Plastridge, W. Nn., and Rettger, L. F. — 1929 — Studies on carbon dioxide. IV. The influence of gaseous environment on growth and toxin production of *C. diphtheriae*. *Jour. of Bact.*, 18 (1): 1-41.

72) Rahn, O. and Richardson, G. L. — 1942 — Oxygen demand and oxygen supply. *Jour. of Bact.*, 44 (3): 321-332.

73) Ramon, G. — 1936 — Sur la production de la toxine et de l'anatoxine staphylococciques. *Compt. Rend. de la Soc. Biol., Paris*, 121: 375-379.

74) Reese, E. T. — 1947 — On the effect of aeration and nutrition on cellulose decomposition by certain bacteria. *Jour. of Bact.*, 53 (4): 389-400.

75) Rodrigues, C. — 1945 — Estudos sôbre a "Manqueira". Do preparo e controle da vacina formolada. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo*, 16 (16): 217-242.

76) Rodrigues, C. — 1953 — Comunicação verbal.

77) Ryu, E. — 1944 — On the influence of shaking upon viability of Pasteur's anthrax spore vaccine. *Japanese Jour. Vet. Sci.*, 6: 71 in *Biol. Abstr.* 1952, 26 (5): 1149 art. 12.447.

78) Sanders, E. and Rice, F. B. — 1947 — Effects of oxygen on rate of growth and metabolism of *Brucella*. (Scient. Proceedings, 47º Gen. Meet. of the Soc. of Amer. Bacteriologists) *Jour. of Bact.*, 54 (1): 16.

79) Sanders, E. and Huddleson, I. F. — 1950 — The influence of atmospheric gases on the multiplication of *Brucella*. *Amer. Jour. of Vet. Research*, 11 (38): 70-75.

80) SANDERS, E. and HUDDLESON, I. F. — 1950 — The influence of oxygen on the metabolic activities of *Brucella*. *Amer. Jour. of Vet. Research*, **11** (38): 75-83.

81) SCHOENING, H. W., DALE, C. N., MOTT, L. O. and HABERMANN, R. T. — 1949 — Pathogenicity of *Salmonella choleraesuis*: maintaining virulence by lyophilization. *Amer. Jour. of Vet. Research*, **10** (35): 101-110.

82) SERTIC, V. et BOULGAKOV, N. A. — 1936 — Sur la sensibilité des souches d' *Eberthella typhi* au bactériophage, en relation avec les caractères antigéniques. *Compt. Rend. de la Soc. de Biol.*, **122**: 35-37.

83) SERTIC, V. et BOULGAKOV, N. A. — 1936 — L'agglutination par la trypaflavine des *Salmonella* de structure antigénique flagellaire non-spécifique. *Compt. Rend. de la Soc. de Biol.*, **123**: 951-952.

84) SERTIC, V. et BOULGAKOV, N. A. — 1937 — Réversion, par acidification de l' agglutination par la trypaflavine. *Compt. Rend. de la Soc. de Biol.*, **124**: 217-218.

85) UNGAR, J., JAMES, A. M., MUGGLETON, P. W., PEGLER, H. F. and TOMLICH, E. H. — 1950 — The cultivation of *Haemophilus pertussis* in partially defined liquid media. *Jour. Gen. Microbiol.*, **4** (3): 345-359.

86) VILJOEN, P. R. and SCHEUBER, J. R. — 1926 — Black-quarter in South Africa: with special reference to improved method of inoculation. 11th and 12th Rept. Diretor Vet. Educ. and Research, Pretoria, Union South Africa, Part. I: 501-570.

87) WALKER, H. H. — 1932 — An aeration train for the study of products of bacterial metabolism. *Jour. of Bact.*, **24** (3): 169-184.

88) WALKER, H. H. — 1932 — Carbon dioxide as a factor affecting lag in bacterial growth. *Science*, New York, **76** (1.982): 602-604.

89) WHITE, P. B. — 1929 — The *Salmonella* group. in "A System of Bacteriology in Relation to Medicine", *Med. Research Coun.*, Vol. 4, pgs. 86-158.

90) WILSON, G. S. — 1930 — The effect on the virulence of *Bact. aertrycke* of cultivation in atmospheres containing varying proportions of oxygen. *Jour. of Hyg.*, **30** (4): 443-467.

91) WILSON, G. S. and MILES, A. A. — 1955 — Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Fourth Edition in two volumes. Edward Arnold (Publishers), Ltd. London.

92) WINSLOW, C. E. A., WALKER, H. H. and SUTERMEISTER, M. — 1932 — The influence of aeration and of sodium chloride upon the growth curve of bacteria in various media. *Jour. of Bact.*, 24 (3): 185-208.

———o———

Vol. 24 — Artigo 2 Novembro de 1957

TÉCNICA DE BORBULHAMENTO NO PREPARO DE VACINAS

II — ESTUDOS SÔBRE VACINAS CONTRA INFECÇÕES POR *SALMONELLA ABORTIVOEQUINA, GALLINARUM, CHOLERAESUIS E KUNZENDORF*

POR

R. Cury e C. Troise

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 4 tabelas no texto

Em trabalho anterior (1) verificamos a possibilidade de se obter excelente vacina, eficiente e atóxica, contra *Salmonella dublin*, pela técnica de semeadura do germe em meios de cultura líquidos, submetidos a borbulhamento contínuo de ar atmosférico.

Os estudos e as verificações detalhadas sôbre a imunidade contra a *Salm. dublin* foram aproveitados e adaptados para o preparo de vacinas contra outras salmonelas.

Estudamos no presente trabalho as vacinas borbulhadas contra as *Salm. abortivoequina, choleraesuis, kunzendorf* e *gallinarum*. Estas salmonelas são todas de grande importância em medicina veterinária.

GERMES USADOS

Usamos no decorrer dêste trabalho muitas amostras de várias espécies de salmonelas: *Salm. choleraesuis*: n.º 627 (original: Inst. R. Koch); *Salm. choleraesuis* var. *kunzendorf*: n.º 628 (original: Inst. R. Koch); *Salm. typhisuis*: n.o 1767 (original: Inst. Adolfo Lutz); *Salm. gallinarum*: n.º H 92, 112, H 150 e 16.046; *Salm. abortivoequina*: n.º 624 (original: Inst. R. Koch), 705 (original: NCTC), 6900 I, 6900 II e 7571.

Estas salmonelas foram todas recebidas da Secção de Epizootias, do Instituto Biológico de S. Paulo, com exceção das amostras de *Salm. gallinarum*, que vieram da Secção de Ornitopatologia do mesmo Instituto e da amostra de *Salm. typhisuis*, que foi fornecida pelo Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro.

Os germes foram mantidos em laboratório em agar chocolate inclinado (em tubos) e freqüentemente passados no camondongo, para manter a virulência. Reidentificamos bioquímica e sorològicamente as amostras várias vezes no decorrer do trabalho.

Os primeiros ensáios em laboratório de parte das amostras das salmonelas citadas, empregadas no preparo de vacinas, figuram na TABELA 1.

TABELA 1

	Cultura de 24 hs. 26-7 a 27-7-1952	Turvação — Escala de Mac Farland	pH da cultura inicial = 7,2	Cultura em meio líquido				Aglutinação de colonias pela tripaflavina			Cultura em meio solido			
				Aglutinação pela tripaflavina	Reação de Molisch	Reação de Millon	Reação do biureto	N.º de colonias testadas	Fracamente positivas	Positivas	Aglutinação pela tripaflavina	Reação de Molisch	Reação de Millon	Reação do biureto
borbulhada	Salm. kunzendorf	9	6,4	+	±	±	+	100	10	84	+	±	±	+
	Salm. choleraesuis	10	7,2	±	+	+	+	100	20	2	—	±	+	+
	Salm. abortivoequina 7571	2×8	7,8	±	+	+	+	100	4	0	±	+	±	—
	Salm. abortivoequina 6900I	2×7	7,0	+	±	—	+	100	4	96	±	—	+	+
	Salm. gallinarum H112	2×6	7,8	±	±	+	+	100	0	0	—	—	+	+
	Salm. gallinarum 16.046	2×7	7,2	+	—	±	—	100	14	36	+	—	—	+
não borbulhada	Salm. kunzendorf	4	6,1	+	—	—	—	100	2	96	+	—	—	+
	Salm. choleraesuis	3	6,0	—	±	—	±	100	4	12	+	—	—	+
	Salm. abortivoequina 7571	3	6,0	±	±	—	±	100	6	94	±	+	+	—
	Salm. abortivoequina 6900I	3	6,0	±	±	—	±	100	0	100	±	±	—	+
	Salm. gallinarum H112	3	6,1	±	±	±	±	100	14	0	—	+	+	—
	Salm. gallinarum 16.046	3	6,0	+	+	—	±	100	6	94	+	±	—	—

Verificando-se nos exames efetuados que as amostras de *Salm. kunzendorf, abortivoequina* 6.900 I e *gallinarum* 16.046, apresentavam percentagem excessiva de formas rugosas, estas amostras passaram por rigorosa seleção de colonias e reativação em camondongos, até que os exames mostrassem percentagem insignificante de formas rugosas, nas culturas borbulhadas.

MÉTODOS DE TRABALHO

Os métodos e técnicas de trabalho foram idênticos aos estudados com detalhes em nosso trabalho anterior (1) já citado, são eles:

Técnica de borbulhamento: Faz-se passar o ar atmosférico filtrado, por aspiração, por intermédio de uma trompa de vácuo (trompa d'água) através do meio de cultura.

Meio de cultura: Foi usado o caldo Hottinger + levedo + glicose + fator acessório de crescimento, que também está convenientemente descrito em nosso trabalho citado.

Em relação ao fator acessório de crescimento e com referência às salmonelas estudadas no presente trabalho, baseamo-nos também nas conclusões de LEDERBERG (7). Juntar asséticamente ao meio de cultura:

a) para a *Salmonella gallinarum* — 15 mg cloridrato de tiamina (vitamina B1) por litro de meio.
b) a *Salm. abortivoequina* não exige fatores acessórios de crescimento, todavia a tiamina na proporção supra citada não exerce ação desfavorável.
c) *a Salm. choleraesuis* é variável em suas exigências, dependendo isto da amostra. De modo geral apresenta os seguintes tipos:

Tipo 1 — não exige fatores acessórios de crescimento.
Tipo 2 — exige metionina.
Tipo 3 — exige triptofano e cistina.
Tipo 4 — exige biotina e tirosina.

Assim sendo, torna-se necessária a prova de cultura prévia das amostras disponíveis, antes de serem usadas no preparo de vacina.

As *Salm. choleraesuis* e *kunzendorf*, usadas em nosso trabalho, quando cultivadas, mesmo em meios sintéticos, mostraram ser do Tipo 1.

Cumpre repetir aqui o que já referimos em nosso trabalho anterior (1) a proposito da Vitamina B 1 para a *Salm. dublin*. Não é indispensável juntar ao meio de cultura os fatores acessórios de

crescimento porquanto o meio por nós adotado já é suficientemente rico em elementos nutritivos. Todavia como parecem êles exercer certa ação favorável, aumentando ligeiramente o crescimento, é interessante que sejam incorporados ao meio.

Inóculo para preparo da vacina: Suspensão, em água fisiologica, do crescimento de garrafas de Roux. Estas garrafas são semeadas com sangue, diluido em caldo Hottinger, colhido de camondongos em agonia após a inoculação da salmonela.

Doses vacinantes: Estabelecemos também nêste trabalho as doses vacinantes de 0,1, 0,2 e 0,4 cm³ por via subcutânea. Estas doses foram usadas em todas as provas de proteção comparadas.

Doses infectantes: Usamos o processo que denominamos "ativação contínua", isto é, inoculando a amostra em camondongo, isolando do sangue, logo após a morte, e inoculando em seguida noutro camondongo e assim por diante, num processo contínuo. O germe atinge seu máximo de virulência e nestas condições de trabalho, a virulência fica então mais ou menos constante para determinada amostra.

Reações bioquímicas: No estudo comparado das amostras usamos, entre outras, as seguintes reações bioquímicas: Aglutinação pela tripaflavina, Reação de Molisch, Reação de Millon e Reação do biureto.

Todas são descritas com detalhes técnicos em nosso trabalho anterior citado.

Reações sorológicas: Usamos o método da aglutinação lenta em tubos, conforme as indicações de KAUFFMANN (6).

TIPOS DE VACINAS ENSAIADAS

Partindo-se de inóculos preparados de idêntico modo e semeando nos mesmos meios de cultura, no decorrer dêste trabalho preparamos e submetemos a provas os seguintes tipos de vacinas:

Vacina borbulhada: a) Semeadura dos inóculos, em separado para cada amostra, em frascos ou em balões com meio de cultura líquido. b) As culturas são incubadas a 37°C e submetidas a um borbulhamento contínuo de ar atmosférico, dentro da estufa. Após várias experiências, o tempo de incubação foi estabilizado em 20 a 22 horas. O borbulhamento deve ser intenso, mas não exagerado. c) Acrescenta-se em cada frasco de cultura, na ocasião de ser levado à estufa, cerca de 5 cm³ de oleo de amendoim estéril, para evitar a formação de espuma durante o borbulhamento. d) Após o borbu-

lhamento junta-se 3 a 4 ‰ (3 a 4 por mil) de formalina (formol a 40%) voltando à estufa durante 72 horas. e) Mistura final das culturas.

Vacina não borbulhada: Obtenção idêntica à da vacina borbulhada, substituindo-se apenas o borbulhamento de ar por agitação manual dos balões uma ou duas vêzes ao dia.

VACINA CONTRA A *SALM. ABORTIVOEQUINA*

As verificações da Seção de Epizootias do Instituto Biológico, as observações de D'APICE (2) e as nossas verificações revelam, pelo exame bacteriológico de abortos das éguas no Estado de São Paulo, a presença da *Salmonella abortivoequina*. Sendo freqüentes êstes encontros e não estando ainda evidenciado o papel do virus do aborto das éguas de DIMOCK e EDWARDS (3), DIMOCK (4), no Estado de São Paulo, assume a salmonela citada grande importância na criação de eqüinos.

Assim sendo, a Vacina contra a *Salmonella abortivoequina* foi estudada, adatando-se a ela os resultados obtidos na *Salm. dublin.*

As antigas vacinas preparadas no Instituto Biológico, caldo de cultura formolado, eram tóxicas para as éguas dando reações locais e gerais às vezes graves, provocando abortos nos animais em gestação.

Estes inconvenientes foram em parte atenuados por D'APICE (2), preparando uma vacina com suspensões de cultura em agar, mortas pelo calor e diluidas em água fisiológica fenicada a 0,5% até a turvação correspondente ao tubo 3 do nefelômetro de McFarland.

Este produto passou à rotina de trabalho do Instituto e faziam-se duas a três inoculações, com intervalo de uma semana ao invés de se empregar dose única.

Resolvemos ensaiar a vacina borbulhada, tomando como termo de comparação uma vacina obtida de idêntico modo, variando apenas no fato da cultura não ser borbulhada. Usamos apenas a cultura não borbulhada para controle pois que em trabalho anterior (1) já tivemos o ensejo de verificar que a vacina borbulhada contra a *Salm. dublin* é mais eficiente que a obtida de culturas em agar.

As vacinas foram injetadas em camondongos por via subcutânea (1/9/1952) e a dose infectante, por via intraperitonial (23/9/1952).

Os resultados figuram na TABELA 2.

TABELA 2

A-7571 = vacina de cultura borbulhada, durante 24 horas, da amostra 7571
A-6900I = vacina de cultura borbulhada, durante 24 horas, da amostra 6900I
N-7571 = vacina de cultura não borbulhada de 24 horas da amostra 7571
N-6900I = vacina de cultura não borbulhada de 24 horas da amostra 6900I
Dose infectante = mistura em partes iguais de culturas ativas de duas amostras de *Salm. abortivoequina* 7571 e 6900I. Culturas de 20 horas em Caldo Hottinger simples a 37°C.
Foram usados 150 camondongos nesta prova divididos em grupos e sub-grupos.

Dose infectante	Tipos de vacinas												Testemunhos
	A-7571			A-6900I			N-7571			N-6900I			
	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	
0,20 cm³	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	10
	1	1	0	0	0	0	1	0	2	2	1	0	6
0,15 cm³	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	10
	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	4
0,10 cm³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	10
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
TOTAIS	30 / 3			30 / 1			30 / 5			30 / 4			30 / 14
Sobreviventes	90%			96,2%			83,3%			86,6%			53,3%

numerador = vacinados denominador = mortos

Verifica-se:

1 — as vacinas borbulhadas protegeram melhor do que as vacinas não borbulhadas;

2 — das vacinas borbulhadas, a amostra 69001 é um pouco mais antigênica;

3 — sobreviveram vários testemunhos mostrando que a *Salm. abortivoequina* não é altamente patogênica para o camondongo, fato aliás já verificado por SOEKAWA (9) e vários outros autores.

Não houve reações tóxicas nos imunizados com vacina borbulhada.

Os camondongos injetados com vacina não borbulhada apresentaram tremores mais ou menos intensos.

Posteriormente às nossas verificações no presente trabalho, ERTURK (5) verificou que as suspensões de *Salm. abortivoequina*, mortas pelo formol e tratadas pelo alumen de cromo, davam vacinas menos tóxicas que as de suspensões mortas pelo calor, mais ainda assim davam reações nos animais inoculados.

VACINA CONTRA AS *SALM. CHOLERAESUIS* E *KUNZENDORF*

O paratifo ou diarréia dos leitões novos assume grande importância epizootiológica no Estado de São Paulo, constituindo mesmo um dos grandes problemas da criação dos suínos. Nas verificações de laboratório, têm sido isolada com mais freqüência a *Salm. kunzendorf*, seguida da *Salm. choleraesuis* e ainda com muito menos freqüência as *Salm. typhisuis*, *Salm. typhimurium*, etc..

Nos trabalhos efetuados, usamos vacinas borbulhadas e não borbulhadas obtidas de mistura em partes iguais de culturas de *Salm. kunzendorf* e *choleraesuis*, reservando-se o preparo das vacinas com as demais salmonelas apenas para os casos especiais de criações onde fossem constatadas.

As vacinas foram injetadas (1/9/1952) por via subcutânea, em camondongos, e a dose infectante, constituida por mistura em partes iguais de culturas ativas de *Salm. kunzendorf*, *choleraesuis* e *typhisuis* (23/9/1952), por via intraperitonial. A inclusão da *Salm. typhisuis* na dose infectante se prende ao fato de seus fatores antigênicos serem encontrados, de acordo com KAUFFMANN (6) nas outras duas salmonelas citadas. Os resultados da prova figuram na TABELA 3.

Verifica-se que a vacina borbulhada ofereceu melhor proteção.

Os camondongos injetados com vacinas não borbulhadas apresentaram reações tóxicas evidenciadas por tremores e prostração. Nada se observou com a vacina borbulhada.

VACINA CONTRA A *SALM. GALLINARUM*

O tifo aviário, causado pela *Salmonella gallinarum*, tem aparecido no Estado de São Paulo, mesmo em criações racionais de galinhas, conforme verificaram REIS e NOBREGA (8).

Os prejuízos ocasionados nos surtos verificados justificam a importância de uma vacina contra a *Salm. gallinarum*.

Preparamos várias vacinas borbulhadas e não borbulhadas para provas, que foram injetadas por via subcutânea (1/9/1952) em

TABELA 3

A = mistura em partes iguais de vacinas obtidas de culturas borbulhadas durante 24 horas de *Salm. kunzendorf* e *Salm. choleraesuis.*

N = mistura em partes iguais de vacinas obtidas de culturas não borbulhadas de 24 horas de *Salm. kunzendorf* e *Salm. choleraesuis.*

Foram usados 90 camondongos nesta prova, divididos em grupos e sub-grupos.

		Tipos de vacinas						Testemunhos
		A			N			
		0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	
Dose infectante	0,20 cm³	3/1	3/1	3/1	3/3	3/1	3/1	10/10
	0,15 cm³	3/0	3/1	3/0	3/1	3/1	3/0	10/9
	0,10 cm³	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	10/9
	Totais	30/4			30/8			30/28
	Sobreviventes	86,6%			73,3%			6,6%
		numerador = vacinados			denominador = mortos			

camondongos. A dose infectante para todas elas incluiu tambem a amostra de *Salm. gallinarum* 16.669 e foi injetada (23/9/1952) por via intraperitonial.

Os resultados figuram na TABELA 4.

Verifica-se melhor proteção das vacinas borbulhadas e, destas, a vacina obtida com amostras H112 é mais antigênica.

Não houve reação tóxica nos camondongos injetados com a vacina borbulhada, observando-se nos inoculados com vacina não borbulhada tremores e prostração.

Os excelentes resultados obtidos nêste trabalho fizeram com que tentassemos experimentações da possível aplicação desta tecnica na obtenção de vacinas eficientes, de baixo custo, em meios líquidos

TABELA 4

A-H112 = vacina obtida de cultura borbulhada durante 24 horas da amostra H112.
A-16.406 = vacina obtida de cultura borbulhada durante 24 hs. da amostra 16.406.
N-H112 = vacina obtida de cultura não borbulhada de 24 hs da amostra H112.
N-16.046 = vacina obtida de cultura não borbulhada de 24 hs da amostra 16.046.
Foram usados 150 camondongos nesta prova, divididos em grupos e sub-grupos.

		Tipos de vacinas												Testemunhos
		A-H112			A-16.046			N-H112			N-16.046			
		0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	0,1 cm³	0,2 cm³	0,4 cm³	
Dose infectante	0,20 cm³	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	10
		1	0	1	0	0	2	1	0	2	2	2	1	9
	0,15 cm³	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	10
		0	0	0	1	3	1	1	0	1	2	2	0	10
	0,10 cm³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	10
		1	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	8
	Totais	30			30			30			30			30
		3			9			6			10			27
	Sobreviventes	90%			70%			80%			66,6%			10%
		numerador = vacinados denominador = mortos												

contra outras moléstias (piobacilose, colibacilose, pasteurelose, adenite equina, etc.), estando as provas em andamento.

E' interessante o estudo da aplicação dêste processo no preparo das vacinas anti-coli, anti-tíficas e outras, para uso no homem.

CONCLUSÕES

1 — Os AA. verificaram, nos decorrer de seus trabalhos, que à semelhança do que foi obtido com a *Salm. dublin* é possível obter excelentes vacinas contra outras salmoneloses, pela técnica de semeadura dos germes em meios de cultura líquidos, submetidos a borbulhamento contínuo de ar atmosférico.

2 — As vacinas obtidas, quando inoculadas em camondongos, mostraram alto poder de proteção e quasi completa ausência de acidentes tóxicos por endotoxinas.

3 — Vacinas obtidas por outra técnica submetidas a idênticas provas, revelaram menor poder de proteção e relativa freqüência de acidentes tóxicos nos animais inoculados.

BUBBLING TECHNIQUE IN THE PREPARATION OF VACCINES

II — STUDIES ON VACCINES AGAINST INFECTIONS BY *SALM. ABORTIVOEQUINA, GALLINARUM, CHOLERAESUIS* AND *KUNZENDORF*

Abstract

Very effective vaccines against Salmonella infections in animals can be obtained after growing the organisms in liquid culture media through which a continuous bubbling of filtered air is forced.

The present paper describes the preparation and testing of vaccines against Salm. choleraesuis, Salm. kunzendorf, Salm. abortivoequina and Salm. gallinarum. These organisms are the frequent cause, in the State of São Paulo, of Typhoid of young pigs, Abortion in mares and Fowl typhoid.

The different batches of vaccines tried showed a high immunizing power with no accidents due to bacterial endotoxins, in the laboratory tests.

The technique used for vaccine preparation, namely the specified culture medium and the bubbling proccess are most favourable for the large-scale production of the vaccines considered in this study.

BIBLIOGRAFIA

1) Cury, R. e Troise, C. — 1957 — Técnica de Borbulhamento no Preparo de Vacinas. Estudos sôbre vacinas contra infecções por *Salmonella dublin*. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo*, 24 (1): 1-34.

2) D'Apice, M. — 1943 — Observações sôbre o aborto contagioso das eguas em São Paulo. *Arqu. Inst. Biol.*, S. Paulo, 14 (16): 235-242.

3) Dimock, W. W. and Edwards, P. R. — 1936 — The Differential Diagnosis of Equine Abortion with Special reference to a hitherto undescribed form of Epizootic Abortion of Mares. *Cornell Vet.*, 26 (3): 231-240.

4) Dimock, W. W. — 1940 — The diagnosis of Virus Abortion in Mares. *Jour. Am. Vet. Med. Assoc.*, 96 (758): 665-666.

5) Erturk, O. — 1955 — A *Salmonella abortusequi* bacterin prepared by treating suspensions of the organism with formalin and chrome alum. *Cornell Vet.*, 45 (3): 440-443.

6) KAUFFMANN, F. — 1951 — Enterobacteriaceae 338 pg. Ejnar Junksgaard Publisher, Copenhagen.

7) LEDERBERG, J. — 1947 — The nutrition of *Salmonella*. *Archives of Biochemistry*, 13 (2): 287-290.

8) REIS, J. e NOBREGA, P. com a colaboração de REIS, A. S. — 1936 — Tratado de Doenças das Aves. Ed. Inst. Biol., São Paulo, 468 pg.

9) SOEKAVA, M. — 1944 — Experimental studies on active immunization against infection with *Salmonella abortivo-equina* in mice. *Japanese Jour. Vet. Sci.*, 6: 60-61 in *Biol. Abstr.* 1952, 26 (5): 1149 art. 12.450.

———o———

TÉCNICA DE BORBULHAMENTO NO PREPARO DE VACINAS

III — EXPERIÊNCIAS DE CAMPO COM VACINAS BORBULHADAS CONTRA SALMONELOSES

POR

C. Troise e R. Cury

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 3 tabelas no texto

Em trabalhos anteriores (1) (2) descrevemos a técnica de preparo das vacinas contra as infecções por *Salm. dublin, abortivoequina, gallinarum, choleraesuis* e *kunzendorf*.

Verificamos que as melhores vacinas dentre as ensaiadas, para cada germe citado, foram obtidas de culturas em meio líquido submetidas a um borbulhamento contínuo de ar atmosférico filtrado.

As culturas e as vacinas foram submetidas a várias provas: bioquímicas, sorológicas e biológicas. As provas de proteção foram efetuadas em camondongos.

Neste trabalho descreveremos as provas feitas em grandes animais e as experiências de campo com o proposito de investigar o uso prático das vacinas borbulhadas contra salmoneloses em bovinos, eqüinos, aves e suinos.

TIPOS DE VACINA ENSAIADAS

Os ensaios descritos neste nosso trabalho foram em sua quase totalidade efetuados com o tipo de vacina que denominamos — vacina borbulhada.

Usamos como controle, em varios animais, a vacina denominada — não borbulhada. Citamos tambem outro tipo de vacina indicado por — vacina de agar.

A descrição detalhada da técnica de preparo destas vacinas, meio de cultura usado e técnica do borbulhamento de ar figuram em trabalho anterior (1).

Não cogitamos da comparação com outros tipos de vacina pelas seguintes razões:

1 — temos já larga experiência prática com varios tipos de vacina, como por exemplo: vacina obtida de culturas em agar e anaculturas em meio líquido;

2 — os tipos de vacinas não usados neste trabalho mostraram em nossos trabalhos anteriores (1) (2) menor valor protetor para o camondongo.

Muitas aplicações de vacina foram por nós efetuadas e diversas pelos proprios criadores sob nossa orientação.

Os animais ficaram sob observação e de vários deles fizemos provas sorológicas.

TÉCNICAS DE VACINAÇÃO

As vacinações foram sempre efetuadas injetando-se a vacina por via subcutânea e as doses recomendadas foram as seguintes:

Vac. contra *Salm. dublin* — em vacas e bezerros — 5 cm³.
Vac. contra *Salm. abortivoequina* — em eguas — 5 cm³.

Vac. contra *Salm. choleraesuis* e *kunzendorf* — em porcas e leitões — 2 cm³.

Vac. contra *Salm. gallinarum* — em galinhas — 1 cm³.

A vacina borbulhada contra a *Salm. dublin* foi usada em bovinos na dose unica de 5 cm³, por via subcutânea, tanto em vacas como em bezerros, embora a experiência chegasse a mostrar que 2 cm³ no bezerro seriam o suficiente.

Recomendou-se vacinar bezerros de 10 a 30 dias de idade, de preferência com 20 dias de idade. Indicou-se a vacinação das vacas no inicio do ultimo mês de gestação.

PENHA e D'APICE (5) indicam a vacinação das vacas antes do parto com a dupla finalidade:

1 — atenuar a reação da vacina no bezerro;
2 — transmitir certo grau de imunidade ao recém-nascido.

Mantivemos nas experiências e nas indicações de nossa vacina borbulhada a recomendação de se vacinar as vacas e tambem as porcas antes do parto, não com a finalidade de atenuar a reação da vacina no bezerro ou no leitão, e sim para transmitir certo grau de imunidade ao recém-nascido, através do colostro, de acôrdo com os trabalhos dos autores citados e de HOWELL e EBY (3), MASON, DALLING e GORDON (4) uma vez que se sabe que os bezerros e os leitões com muito poucos dias de idade não são capazes de produzir anticorpos por injeção da vacina, de acôrdo com WILSON e MILES (6).

A vacina borbulhada contra a *Salm. abortivoequina* foi sempre usada na dose unica de 5 cm³, injetando-se em eguas 1 a 3 meses antes do parto.

A dose única mostrou-se suficiente, não sendo necessário como se fazia com as antigas vacinas, duas a três inoculações com intervalo de uma semana entre cada inoculação.

As vacinas contra as *Salm. choleraesuis* e *kunzendorf*, foram a semelhança da vacina contra a *Salm. dublin* e pelas mesmas razões, injetadas na porca 1 a 2 meses antes do parto e no leitão de 10 a 30

dias de idade. Usou-se dose única de 2 cm^3 tanto para a porca como para o leitão.

A vacina contra a *Salm. gallinarum* foi usada na dose única de 1 cm^3 em galinhas adultas. Pelo fato de, em nosso Estado, o Tifo aviário se apresentar em surtos esporádicos, foi ela empregada sempre em criações onde já se tinha noticiado casos da moléstia. Posteriores verificações indicaram ser mais eficiente o uso de 2 doses de 1 cm^3, com intervalo de uma semana entre cada dose.

O número de cm^3 das doses das vacinas experimentadas foi aumentando unicamente nos casos onde procuramos observar a tolerância da vacina e a possibilidade de acidentes tóxicos.

VACINAÇÃO CONTRA A *SALMONELLA DUBLIN*

O Paratifo, Enterite infecciosa ou Diarréia dos bezerros causado pela *Salm. dublin* é frequente em criações de bovinos no Estado de São Paulo.

Foi facil, no decorrer deste trabalho, encontrar criações infectadas onde pudessem ser realizadas as nossas provas e observados os resultados.

As experiências foram realizadas em várias propriedades do Governo do Estado, e em propriedades particulares, com o consentimento dos respectivos criadores. Várias raças de bovinos em condições diferentes de higiene, clima e alimentação foram submetidas à experimentação.

Escolheram-se de preferência propriedades onde já havia casos de Paratifo dos bezerros. Foram feitos exames bacteriológicos e sorológicos para diagnósticos das salmonelas encontradas e vários dos animais vacinados foram submetidos às provas de sôro-aglutinação.

Descrever-se-ão estas experiências em separado, por propriedades onde foram realizadas:

1 — F. R.

Bragança Paulista

Este criador vacinou 380 bezerros de Janeiro de 1953 a Agosto de 1954; algumas vacinações por um de nós efetuadas e outras sob nossa orientação. Antes das vacinações, 4 exames de medula óssea de bezerros mortos e 5 exames de fezes revelaram *Salm. dublin*. A criação era de gado mestiço Zebú e a aplicação da vacina fez cessar todos os casos de diarréia por Paratifo e seu conseqüente prejuízo econômico. Nas ultimas vacinações, o criador já tinha também intro-

duzido o gado holandês em sua criação. Não observou nenhuma reação geral ou local que pudesse ser atribuida a toxidez da vacina.

2 — A. E. S. A.

São João da Boa Vista

Havia casos de Paratifo dos bezerros. A vacina foi aplicada em 300 animais de Fevereiro a Setembro de 1953. Foram feitas duas aplicações em bezerros, uma no dia do nascimento e outra 15 dias depois. Não foram vacinadas as vacas. Não se observou nenhum acidente tóxico. Cessaram os casos de diarréia dos bezerros.

3 — J. C. F.

Bocaina

Vacinou 100 vacas em gestação durante os meses de Agosto e Setembro de 1954. Não houve casos de reação local ou geral.

4 — C. Q. T. M.

Jundiaí

Vacinou 50 bezerros durante o mês de Junho de 1953. Um dos bezerros vacinados morreu 24 horas após a vacinação. Não tendo sido observado durante êste período e não havendo sido determinada a causa da morte, o interessado quis atribuir isto à vacina; todavia, a morte parece-nos um tanto retardada para ser atribuída a um acidente tóxico e a falta de observação do caso tambem não permite qualquer tipo de conclusão.

5 — J. A. P.

Amparo

Aplicou a vacina em 30 bezerros de Janeiro a Março de 1953. Não se verificou acidentes. Consultado meses depois, revelou não ter observado casos de paratifo nos vacinados.

6 — M. J.

São José do Rio Pardo

Injetou 400 doses de Vacina em bezerros nos meses de Agosto a Novembro de 1954. Vacinou de preferência bezerros com 8 dias de idade. Não houve reações gerais ou locais em conseqüência da vacina. Alguns bezerros ficaram ligeiramente apáticos, mas no dia seguinte estavam todos normais. Não usou a vacina em vacas. Não verificou casos de paratifo a partir do 10.º dia após a vacinação.

7 — V. F. D.

São José do Rio Pardo.

Empregou 200 doses de vacina de Setembro a Novembro de 1954. Vacinou de preferência bezerros com 8 dias de idade. Não se observou casos de reações gerais ou locais. Não foram vacinadas as vacas. Dez dias após a vacinação, não mais observou casos de paratifo nos bezerros vacinados, continuando a observá-los nos bezerros que não receberam vacina.

8 — 9 — 10 — 11 e 12 — Diversos

São Paulo, Bocaina e Campinas

Em 5 criações, 2 pertencentes ao Governo do Estado e 3 de particulares, foram efetuadas vacinações de bezerros com as seguintes finalidades:

a — proceder a sôro-aglutinação antes e após a vacinação, com as vacinas borbulhadas e não borbulhadas;

b — verificar o que sucede quando se aumenta a dose, nas vacinas borbulhadas e não borbulhadas.

Trinta e oito bezerros foram submetidos à prova.

Os resultados figuram na TABELA 1.

Uma análise da tabela mostra:

a — com as doses de 5, 10 e 15 cm^3, nenhuma reação apreciável se observou na vacina borbulhada, com exceção do bezerro n.º de ordem 35, que recebeu dose tripla, mostrando leves tremores que desapareceram logo, sem qualquer seqüela.

b — com as doses de 5, 10 e 15 cm^3 na vacina não borbulhada, observou-se que em 12 bezerros vacinados houve os seguintes acidentes:

n.º de ordem 18 — regular reação geral: tremores e depressão;

n.º de ordem 19 — grave reação geral: tremores, dispnéia e prostação;

n.º de ordem 32 — gravissima reação geral: 40 minutos após a injeção, mostrou fortes tremores, dispnéia, prostação e morreu após 5 horas;

n.º de ordem 36 — gravíssima reação geral: 40 minutos após a injeção, mostrou fortíssimos tremores, dispnéia acentuada, tendo morte brusca 10 minutos depois.

c — a sôro-aglutinação, tanto nas vacinas borbulhadas como nas vacinas não borbulhadas, não respondeu de maneira quantitativamente proporcional ao antígeno. O teor de aglutininas variou, ao

TABELA 1

N.º de ordem	Nome do bezerro	Data do nascimento	Título aglutinante do soro colhido antes da vacinação: Data da colheita	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno O	Antígeno H	Vacinação (via subcutânea): Data	Tipo de Vacina	Dose em cm³	Título aglutinante do soro colhido após a vacinação: Data da colheita	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno O	Antígeno H	Vacinação da vaca	Local
1	—	3/11/51		1:10	0		B	5		1:80	1:40		
2	—	1/11/51		1:10	0		"	"		1:160	1:180		
3	—	18/8/51		1:5	0		"	"		1:40	1:320		Instituto Biológico
4	—	21/8/51		0	0		"	"		1:80	1:160	Sim	
5	—	5/8/51		0	0		"	"		1:160	1:160		São Paulo
6	—	20/5/51	20/11/1951	1:20	1:20	20/11/1951	"	"	30/11/1951	1:40	1:640		
7	Banana ...	12/10/51		0	0		B	5		1:80	1:80		
8	Rancheira .	2/11/51		0	0		"	"		1:80	1:80		
9	Veluda	17/11/51		0	0		"	"		1:320	1:320		
10	Cachoeira .	16/9/51		1:20	0		"	"		1:160	1:80		
11	Primeira ..	14/12/51		0	0		"	"		1:5	1:10		Fazenda F
12	Negrinha ..	15/10/51		0	0		"	"		1:20	1:320	Sim	
13	Bordada ..	1/11/51		1:15	0		"	"		1:80	1:160		Bocaina
14	Tapena	4/11/51	17/12/1951	0	0	17/12/1951	"	"	20/5/1952	1:20	1:80		
15	Salina	18/11/51		0	0		"	"		1:80	1:80		
16	Soberba ...	13/12/51		0	0		"	"		1:40	1:80		
17	343	—		1:10	0		NB	5		1:5	1:160		
18	345	—		0	0		"	5		0	1:5		
19	350	—		0	0		"	10		1:20	1:80		Granja S.A.
20	344	—		0	0		"	15		1:40	1:160	Não	
21	340	—	9/5/1952	1:5	1:10	9/5/1952	B	5	20/5/1952	1:80	1:160		Campinas
22	342	—		0	0		"	10		1:80	1:80		
23	Irene	14/3/52		0	0		B	5		1:160	1:40		
24	Faceira ...	24/2/52		0	0		"	"		1:160	1:80		
25	Copacabana	11/2/52		1:20	0		"	"		1:160	1:160		
26	Esterlina .	4/3/52		0	0		NB	"		1:80	1:80		
27	Altiva	27/3/52		1:5	0		"	"		1:80	1:80		Granja S.C.
28	Bruma	23/2/52		1:10	0		B	"		1:80	1:160		
29	Beldade ...	23/4/52		0	0		"	"		1:160	1:160	Não	Campinas
30	Brigida ...	24/4/52	20/5/1952	0	0	20/5/1952	NB	5	2/2/1952	1:40	1:160		
31	Janda	21/4/52		0	0		"	"		1:40	1:160		
32	Zeni (+) ...	9/5/52		0	0		"	"		—	—		
33	Faisca	15/5/52		0	0		NB	8		1:80	1:160		Fazenda
34	Jaiba	14/5/52		0	0		B	10		1:160	1:160		Mato Dentro (Instituto Biológico)
35	Graciosa ..	26/4/52		0	0		"	15		1:160	1:160		
36	Himalaia (+)	28/4/52		0	0		NB	15		—	—	Sim	
37	Orotava ..	1/5/52		0	0		B	15	2/2/52	1:160	1:80		
38	Garça	1/5/52	20/5/1952	1:10	0	20/5/1952	NB	10		1:80	1:80		Campinas

B = Vacina borbulhada

NB = Vacina não borbulhada

que parece, de acôrdo com a suscetibilidade individual e não com o tipo ou com a quantidade de antígeno injetada.

Esta experiência mostrou que a sôro-aglutinação, no presente caso, teve apenas valor qualitativo em relação à indicação de imunidade. Todavia, observamos nos animais injetados com a vacina borbulhada, de um modo geral, maior proporção de anticorpos *O* em relação aos anticorpos *H*, quando se compara com a vacina não borbulhada. O anticorpo *O* é, como se sabe, o responsável pela imunidade.

13 — Fazenda Experimental do Departamento da Produção Animal Pindamonhangaba.

Nesta fazenda, por gentileza do dr. José Gomes Vieira, Médico-Veterinário, as seguintes experimentações foram efetuadas:

a — 19 bezerros foram injetados em dias variáveis após o nascimento;

b — foram feitas aplicações de uma dose e de duas a três doses de vacina, com intervalos variáveis.

Os resultados figuram na TABELA 2.

Verificou-se que:

1 — De um modo geral a sôro-aglutinação mostra ligeiro aumento quando se faz mais de uma dose de vacina com razoável intervalo entre as aplicações. Todavia, muitas exceções tambem indicam que neste caso influi a suscetibilidade do animal.

2 — A vacinação vários dias após o nascimento parece ser melhor que a feita após o nascimento. Todavia, as variações individuais não permitem que se faça juízo seguro e vem confirmar os resultados da TABELA 1, parecendo indicar que a sôro-aglutinação tem mais valor qualitativo do que quantitativo.

Dêste modo, nas experiências das tabelas 1 e 2, pode-se concluir que, quando um animal está vacinado, revela razoável teor de anticorpos. Mas não se pode concluir que um bezerro esteja mais sòlidamente imunizado do que outro, cujo teor de aglutininas seja menor.

O estado geral após a vacinação mostrou, nos 19 animais considerados, ausência completa de reações locais e gerais.

Todavia, nesta fazenda foram vacinados um total de 250 bezerros. As vacinas foram enviadas em três remessas, respectivamente de 100, 50 e 100 doses em ocasiões diversas. As vacinas foram borbulhadas, mas cada remessa foi preparada em diferente tipo de meio de cultura, sendo respectivamente: a 1.ª em caldo Hottinger + glicose; a 2.ª em caldo Hottinger + dialisado de figado + glicose +

TABELA 2

Vacinação : [illegible] vacina borbulhada, dose única de 5 cm³, via subcutânea
Data[illegible] todas as datas se referem ao ano de 1952

Nº de ordem	Nome do bezerro	Data do nascimento	Título aglutinante do sôro colhido antes da vacinação			Data da 1.ª vacinação	Título aglutinante do sôro colhido após a 1.ª vacinação			Data da 2.ª vacinação	Título aglutinante do sôro colhido após a 2.ª vacinação			Data da 3.ª vacinação	Título aglutinante do sôro colhido após a 3.ª vacinação			Vacinação da vaca	Nome da vaca
			Data da colheita	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno O	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno H		Data da colheita	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno O	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno H		Data da colheita	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno O	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno H		Data da colheita	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno O	Aglutinação lenta em tubos: Antígeno H		
1	Verbo	23/5	—	—	—	2/6	—	—	—	9/6	14/6	1:40	1:80						
2	Vanguarda.	25/5	—	—	—	9/6	14/6	1:40	1:5	—	—	—	—						
3	Vermute ..	30/5	—	—	—	9/6	14/6	1:80	1:160	—	—	—	—						
4	Vaidade ...	18/5	—	—	—	26/5	—	—	—	9/6	14/6	1:160	1:160						
5	Vinagre ...	18/5	—	—	—	26/5	—	—	—	9/6	14/6	1:80	1:80					Sim	
6	Vagalume .	11/5	—	—	—	19/5	—	—	—	2/6	14/6	1:20	1:160						
7	Veneza	20/6	20/6	1:20	1:40	20/5	5/7	1:40	1:160	5/7	21/7	1:40	1:320	21/7	5/8	1:40	1:160		Rainha
8	Veludo	26/6	9/7	1:5	1:5	9/7	25/7	1:5	1:20	25/7	—	—	—	—	—	—	—		Promessa
9	Vassalo ...	4/7	4/7	1:40	1:80	4/7	18/7	1:40	1:320	18/7	4/8	1:80	1:160	4/8	19/8	1:80	1:640	Sim	Centaurea
10	Virgula ...	5/7	5/7	1:10	1:40	5/7	21/7	1:10	1:80	21/7	5/8	1:10	1:160	5/8	20/8	1:160	1:320		Rabeca
11	Patusco ...	5/7	21/7	1:320	1:320	21/7	5/8	1:320	1:640	5/8	20/8	1:320	1:640	—	—	—	—		Palha
12	Viuva	1/8	1/8	1:40	1:80	1/8	16/8	1:160	1:160	16/8	1/9	1:320	1:160	1/9	19/9	1:320	1:320	Sim	Perola
13	Vencedor ..	19/7	4/8	1:20	1:160	4/8	19/8	1:640	1:320	19/8	8/9	1:640	1:640	—	—	—	—		Proeza
14	Vanga	22/7	22/7	1:80	1:10	22/7	6/8	1:80	1:20	6/8	21/8	1:80	1:320	21/8	5/9	1:80	1:640		Saga
15	Volupia ...	—	13/8	1:20	1:160	13/8	27/8	1:40	1:160	27/8	12/9	1:80	1:160	—	—	—	—		
16	Vingança .	—	16/8	1:40	1:160	16/8	1/9	1:20	1:640	1/9	15/9	1:80	1:320	—	—	—	—		
17	Vanito	—	28/8	1:20	1:640	28/8	5/9	1:80	1:640	5/9	22/9	1:320	1:640	—	—	—	—	Sim	
18	Vontade ..	—	25/8	1:40	1:80	25/8	19/9	1:80	1:80	19/9	29/9	1:80	1:80	—	—	—	—		
19	Vinção	—	27/8	1:80	1:160	27/8	12/9	1:160	1:160	12/9	27/9	1:160	1:80	—	—	—	—		

levedo seco + sangue hemolisado + peptonas; e a 3.ª caldo Hottinger + água de levedo Fleischmann + glicose + vitamina B 1.

Foi observado que a 2.ª remessa produziu, em muitos bezerros, uma reação geral, mesmo na dose de 5 cm^3, apresentando os vacinados apatia, tremores e dispnéia. Esta reação regredia e desaparecia em pouco tempo, sem conseqüências graves.

Este fato só foi observado com a citada remessa de vacina, que na prática só foi usada nesta ocasião.

Em nenhuma outra ocasião, com vacinas borbulhadas preparadas com qualquer outro tipo de meio de cultura, pôde-se observar tal fato. A única explicação plausível é que o meio de cultura citado, sendo excessivamente rico em proteínas, possa ter produzido um verdadeiro choque protêico.

E de se notar, em vista dêstes fatos, que a 3.ª remessa de vacina, a título experimental, foi injetada em doses de 10 a 20 cm^3 em vários bezerros sem que se notasse qualquer reação.

VACINAÇÃO CONTRA A *SALMONELLA ABORTIVOEQUINA*

O aborto infecioso das eguas, causado pela *Salm. abortivoequina*, embora por varias vezes já tenha sido observado no Estado de São Paulo, só poude por nós ser constatado uma só vez no decorrer dos trabalhos sobre vacinas borbulhadas.

A criação onde nossa vacina foi experimentada é mantida em excelentes condições de higiene e possue animais de raças apuradas.

1 — R. M.

Santa Rita do Passa Quatro

Tinha vários casos de abortos em éguas de sua criação. Do sangue de uma das éguas que abortaram, pudemos isolar cultura pura de *Salmonella abortivoequina*.

Usou a vacina preparada de culturas em agar durante algum tempo, mas depois abandonou-a, porque observou reações gerais, tremores, dispnéia, prostação, etc., às vezes graves em vários animais vacinados. Em alguns casos éguas vacinadas em gestação avançada abortaram após a vacinação.

Usou a vacina borbulhada em 30 léguas, não observou reações e desapareceram os casos de aborto. A vacina borbulhada usada tinha turvação igual ao tubo 9 da Escala nefelométrica de Mc Farland, enquanto que a vacina de agar tem sua turvação padronizada apenas ao tubo 3 Mac Farland, justamente, como já foi dito, para evitar acidentes de vacinas concentradas. Apesar dêstes cuidados, os acidentes às vêzes aparecem, como acontecia no presente caso.

VACINAÇÃO CONTRA A *SALMONELLA GALLINARUM*

O Tifo aviário, causado pela *Salm. gallinarum*, ocorreu em vários surtos, durante a realização de nossas experiências, todos em criações em excelentes condições de higiene.

A vacina contra a *Salm. gallinarum* foi experimentada em 7 granjas onde já se havia declarado a moléstia. Os exames de laboratório permitiram o isolamento do germe responsável.

A vacina foi usada sempre na razão de uma dose por galinha. Em cada granja já foi preenchido um questionário, de maneira que os resultados podem ser apresentados numa só tabela, conforme podemos observar da TABELA 3.

Verifica-se que foram vacinadas 7.322 galinhas, das quais 961 estavam aparentemente doentes na ocasião da vacinação.

Os resultados, de um modo geral, foram excelentes, considerando-se que morreram 268 galinhas após a vacinação, de um total onde já havia 961 doentes.

Os vacinados, em sua maioria, apresentaram reações locais e gerais, todavia todas foram transitórias e nenhum acidente grave se observou.

Em duas granjas houve casos de morte, por Tifo aviário, além de 15 dias após a vacinação. Embora estas mortes se tenham verificado em aves já doentes de granjas fortemente atingidas, resolvemos, como medida de maior segurança, indicar a partir destas experimentações o uso de 2 doses de 1 cm^3, com intervalo de uma semana entre cada dose.

VACINAÇÃO CONTRA AS *SALM. CHOLERAESUIS E KUNZENDORF*

O Paratifo, Enterite infecciosa ou Diarréia dos leitões constitue um dos problemas da criação de suinos no Estado de São Paulo, mòrmente onde a higiene das criações não é considerada com o devido cuidado.

Nos exames bacteriológicos efetuados mostra predominância a *Salm. kunzendorf*, seguida da *Salm. choleraesuis* e ainda com muito menos freqüência a *Salm. typhisuis*, *Salm. typhimurium*, etc.

Em nosso trabalho de campo usamos uma vacina mixta constituida de associação, em partes iguais, das vacinas contra as duas primeiras salmonelas citadas.

1 — M. S.

Bragança Paulista

Este criador tinha já há muitos anos, enzoòticamente em sua criação, o paratifo dos leitões. Todavia, em meados de 1952 houve

TABELA 3

Nome do proprietário	Município	N.º total de aves da granja	N.º total de aves mortas de tifo antes da vacinação	N.º de aves aparentemente sadias na ocasião da vacinação	N.º de aves aparentemente doentes na ocasião da vacinação	N.º de aves injetadas com vacina borbulhadas contra o tifo	Data da vacinação	Reação da Vacina	Aves mortas de tifo após a vacinação						
									1.º ao 5.º dia	6.º ao 10.º dia	11.º ao 15.º dia	16.º ao 20.º dia	21.º ao 25.º dia	26.º ao 30.º dia	30.º ao 40.º dia
S. N.	Itapecerica.	1.450	500	900	50	900	15/2/53	Pequena falta de apetite transitoria	0	1	1	0	0	0	0
T. I.	Cotia	1.420	20	1.395	5	1.400	15/2/53	Nenhuma reação	14	4	3	0	0	0	0
S. N.	Itapecerica.	1.000	200	780	20	800	25/2/53	Ligeira vermelhidão no local da vacina em algumas aves	5	0	0	0	0	0	0
G. G.&R.	Tambaú ...	876	10	836	30	866	14/8/53	Inchaço local, falta de apetite e queda transitória da postura	49	31	12	0	0	0	0
S. S.	Baruerí ...	1.360	4	1.300	56	556	5/11/53	Falta de apetite e apatia transitórias	4	4	1	0	0	0	0
T. B.	Bragança Paulista ...	1.725	25	1.200	500	1.700	11/11/53	Nenhuma reação	31	26	31	13	10	6	0
K. Z.	Mogí das Cruzes	2.400	200	1.900	300	1.100	18/11/53	Falta de apetite transitoria	16	6	7	3	0	0	0
Totais		10.231	959	8.311	961	7.322			119	72	45	16	10	6	0

recrudescimento da moléstia e neste grande surto perdeu, em cêrca de três meses, mais de 800 leitões.

Fizemos 80 exames de fezes, isolando *Salm. kunzendorf, typhisuis, typhimurium, Pseudomonas aeruginosa,* etc.

Foi instituída a vacinação na porca 15 a 30 dias antes do fim da gestação e nos leitões na idade de 12 a 15 dias. A dose recomendada foi de 3 cm^3 na porca e 2 cm^3 no leitão. Não houve reação geral nem local, mesmo em 30 porcas e em 100 leitões nos quais a título experimental, foi usada a dose única de 5 cm^3.

De Dezembro de 1952 a Março de 1954, foram vacinados cêrca de 100 porcas e 900 leitões. Nenhum acidente foi registrado e o paratifo dos leitões desapareceu da criação.

2 — F. C.

Bragança

Havia paratifo em todos os abrigos de leitões. Em 40 exames de fezes foram isoladas *Salm. kunzendorf, choleraesuis, typhimurium,* etc..

Vacinou durante o ano de 1953 cêrca de 700 suínos, usando a vacina em leitões até com 5 dias de idade. Não houve reação mesmo em doses duplas e triplas de vacina borbulhada, usadas a título experimental. Os resultados gerais foram ótimos, não tendo aparecido o paratifo em nenhum dos vacinados.

3 — J. S.

São Paulo

Criação em péssimas condições de higiene. Pocilgas de madeira de dificil desinfecção, alimentação constituída de restos de comida de hotel e restos de verdura do mercado. Este criador perdia anualmente cêrca de 50% da produção de leitões.

Isolamos nos exames de fezes *Salm. kunzendorf, Salm. typhisuis,* etc..

A vacinação passou a ser feita desde Junho de 1954 até o presente, tendo vacinado durante esta época 750 suínos. Usou a vacina na porca, aproximadamente um mês antes do fim da gestação e nos leitões com 15 a 30 dias de idade. As vêzes, a vacina foi feita só no leitão, quando as porcas eram muito pesadas ou muito ariscas. Teve absoluto sucesso, desaparecendo a moléstia e conseqüentemente as grandes perdas.

CONCLUSÕES

1 — A técnica de semeadura das salmonelas em meios de cultura líquidos, submetidos a borbulhamento contínuo de ar atmosférico permite a obtenção de vacinas excelentes para uso prático.

2 — As experimentações de campo num total de 1.758 bovinos, 30 equinos, 2.450 suinos e 7.322 aves revelaram ser as vacinas borbulhadas inócuas e de alto poder protetor.

3 — Vacinas obtidas por outras técnicas submetidas a idênticas provas, revelaram menor poder de proteção e relativa freqüência de acidentes tóxicos nos animais inoculados.

4 — As observações durante espaços de tempo que variaram de 6 meses a 1 ano, nas diversas propriedades onde foram usadas as vacinas borbulhadas mostraram completa ausência de salmoneloses nos animais vacinados.

5 — Os resultados práticos obtidos com as vacinas borbulhadas contra *Salm. dublin, abortivoequina, gallinarum* e *choleraesuis-kunzendorf,* que no Estado de São Paulo causam respectivamente a enterite infecciosa ou paratifo dos bezerros, o aborto equino, o tifo aviário e a enterite infecciosa ou paratifo dos leitões, permitem recomendar ampla difusão do uso dêste tipo de vacinas.

BUBBLING TECHNIQUE IN THE PREPARATION OF VACCINES

III — FIELD TRIALS WITH BUBBLING VACCINES AGAINST *SALMONELLA* INFECTIONS

Abstract

Very effective vaccines against Salmonella infections in animals can be obtained after growing the organisms in liquid culture media through which a continuous bubbling of filtered air is forced.

The present papers describes the field trials of bubbling vaccines against Salm. dublin, abortivoequina, gallinarum and choleraesuis-kunzendorf. Those organisms are the frequent cause, in the State of São Paulo, of Calf diarrhea, Abortion in mares, Fowl typhoid and Typhoid of young pigs.

In the field trials the vaccines were inoculated into 1,758 bovine, 30 mares, 2,450 pigs and 7,322 chickens.

The different batches of vaccine tried showed a high immunizing power with no accidents due to bacterial endotoxins.

BIBLIOGRAFIA

1) Cury, R. e Troise, C. — 1957 — Técnica de borbulhamento no preparo de vacinas. I — Estudos sôbre vacinas contra infecções por *Salmonella dublin*. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo,* 24 (1): 1-34.

2) Cury, R. e Troise, C. — 1957 — Técnica de borbulhamento no preparo de vacinas. II. Estudos sôbre vacinas contra infecções por *Salm. abortivoequina, gallinarum, choleraesuis e kunzendorf*. *Arq. Inst. Biol. S. Paulo,* 24 (2): 35-45.

3) Howell, K. M. and Eby, H. — 1920 — The transmission of specific immune bodies from the mother to the young. *Jour. Inf. Dis.,* 27: 550-556.

4) Mason, J. H., Dalling, T. and Gordon, W. S. — 1930 — Transmission of maternal immunity. *Jour. Path. and Bact.,* 33: 783-797.

5) Penha, A. M. e D'Apice, M. — 1950 — Contribuição ao estudo da enterite infecciosa dos bezerros. II. Experiências de vacinação e mecanismo de transmissão da imunidade da vaca ao bezerro. *Arq. Inst. Biol.,* S. Paulo, 19 (19): 309-324.

6) Wilson, G. S. and Miles, A. A. — 1955 — Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Fourth Edition in two volumes. Edward Arnold (Publishers), Ltd. London.

Vol. 24 — Artigo 4 Novembro de 1957

TÉCNICA DE BORBULHAMENTO NO PREPARO DE VACINAS

IV — ESTUDOS SÔBRE AÇÃO DA CLOROFILA NAS ENDOTOXINAS DAS SALMONELAS E SEU EMPREGO NAS VACINAS BORBULHADAS

POR

R. Cury e C. Troise

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 3 tabelas no texto

Em publicações anteriores (1) (2) (6) estudamos a técnica de preparo, provas e aplicações práticas das vacinas, que denominamos — borbulhadas contra as infecções por salmonelas em várias espécies animais.

Nas experiências de campo, observamos que, quando se injetava 20 a 30 cm^3 em bezerros, ou seja 4 a 6 vêzes a dose recomendada, em raros casos havia manifestações de pequena depressão e alguns tremores que logo desapareciam.

Embora êste fato não tenha importância alguma sob o ponto de vista prático, resolvemos fazer alguns ensáios para eliminar estes resquícios de toxidez da vacina.

Constitui objeto deste trabalho estudar as possibilidades de eliminar ou neutralizar a toxidez das culturas de salmonelas.

MÉTODOS DE TRABALHO

Germe: As experiências foram efetuadas com a *Salmonella dublin*, amostra n.º 7657, recebida da Secção de Epizootias, do Instituto Biológico. A escolha desta espécie de *Salmonella* se prende ao fato dos acidentes citados terem sido observados apenas com altas doses de Vacina contra *Salmonella dublin*.

Meio de cultura: Usamos dois tipos de meios de cultura:

1 — Caldo Hottinger + água de levedo Fleischmann + glicose + vitamina B1.

2 — Caldo Hottinger + extrato de levedo Fleischmann + glicose + vitamina B1.

A descrição detalhada destes meios de cultura e a maneira de obter seus ingredientes já foi explanada em trabalho anterior (1).

Tipos de vacina: Empregamos nas provas dois tipos de vacinas, que denominamos de: borbulhada e não borbulhada.

Detalhes sôbre êstes tipos de vacinas são encontrados em nosso trabalho anterior (1).

Para efetuar as pesquisas que constituem objeto deste trabalho, juntamos ao meio de cultura, e às culturas, algumas substancias que poderiam agir sobre o fator tóxico das salmonelas, e experimentamos, no camondongo, em altas doses, as vacinas assim tratadas.

Procuramos deste modo completar os trabalhos de HUTNER e ZAHL (4) e ZAHL e HUTNER (7) e ZAHL, DRASHER e HUTNER (8) que fizeram varias experimentações para neutralizar a endotoxina das salmonelas.

Pelo fato de ser muito dificil obter acidentes tóxicos com a cultura borbulhada, usamos a cultura não borbulhada, baseando-nos na idéia de que a substância que elimina a toxidez desta provavelmente poderia ser acrescentada, caso se desejasse, à vacina borbulhada, que é obtida do mesmo modo, variando apenas no fato de ser submetida ao borbulhamento de ar.

ENSAIOS COMPARADOS DE NEUTRALIZAÇÃO DAS ENDOTOXINAS

Preparamos uma série de vacinas com adição de várias substâncias. Estas vacinas foram submetidas a provas em camondongos. Anotamos as reações tóxicas, após a injeção das vacinas e o poder de proteção após a inoculação infectante.

Na TABELA I figuram as substâncias acrescentadas, as provas e os resultados desta experiência:

Verifica-se pelos resultados indicados na tabela que a clorofila juntada antes ou depois do crescimento do germe é a única substância capaz de evitar a ação tóxica da vacina não borbulhada, sem afetar o poder protetor. As demais substâncias ou não evitam a reação tóxica ou interferem de algum modo na proteção, sendo de se notar que algumas têm ação impediente no crescimento das salmonelas.

E' interessante assinalar que a clorofila, de acôrdo com as observações de RIBEIRO e LACERDA (5) é também capaz de neutralizar o efeito tóxico da toxina do *Clostridium tetani.*

ENSAIOS DE INOCUIDADE DA CLOROFILA NAS CULTURAS BORBULHADAS

À vista dos resultados da experiência anterior, resolvemos ampliar as observações com a clorofila. Foram preparados os seguintes tipos de culturas, indicado na TABELA 2, sendo todos eles submetidos a borbulhamento contínuo durante 20 horas.

Em todas as culturas a proporção de clorofila foi de 0,8% de uma suspensão ou de uma solução aquosa a 2,5%.

TABELA 1

Vacina tipo 1 (Vacina controle): obtida de cultura não borbulhada de *Salm. dublin* amostra 7657, incubada durante 24 horas a 37°C, morta pelo formol.

Vacina tipo 2 A: igual a 1 acrescentando-se ao meio 10% de uma solução aquosa de Citrato de sódio a 10% antes da semeadura.

Vacina tipo 2 B: igual a 2 A sòmente que a solução é acrescentada após o crescimento do germe antes de se juntar o formol.

Vacina tipo 3 A: igual a 1 acrescentando-se ao meio 10% de uma solução aquosa de Cloreto de calcio a 10% antes da semeadura.

Vacina tipo 3 B: igual a 3 A sòmente que a solução é acrescentada após o crescimento antes de juntar o formol.

Vacina tipo 4 A: igual a 1 acrescentando-se ao meio 5% de uma solução aquosa a 10% de Sulfato duplo de aluminio e potassio (alumen) antes da semeadura.

Vacina tipo 4 B: igual a 4 A sòmente que a solução é acrescentada após o crescimento antes de juntar o formol.

Vacina tipo 5 A: igual a 1 acrescentando-se ao meio 0,4% de uma suspensão aquosa a 5% de clorofila não solúvel em água antes da semeadura.

Vacina tipo 5 B: igual a 5 A sòmente que a suspensão é acrescentada após o crescimento antes de juntar o formol.

Vacinação = foi efetuada por via subcutânea (2/6/1953), nas grandes doses de 0,6, 0,8 e 1 cm³ respectivamente em cada sub-grupo de 3 camondongos. Foram usados 90 camondongos nesta prova, divididas em grupos e subgrupos.

Dose infectante = constituida de mistura de culturas de 20 horas a 37°C, de 5 amostras de *Salm. dublin* em caldo Hottinger simples, injetada por via intraperitonial (22/7/1953) na dose de 0,050 cm³.

	N.º total de vacinados	Acidentes tóxicos				Percentagem de acidentes toxicos		Dose infectante de prova. N.º de camondongos inoculados	Proteção n.º de camondongos mortos	Percentagem final de sobreviventes
		Não mortais antes de 24 hs.	Mortais antes de 24 hs.	Não mortais após 24 hs.	Mortais após 24 hs.	Não mortais	Mortais			
Vac. tipo 1	9	2	0	0	2	22,2%	22,2%	7	0	77,7%
Vac. tipo 2A ...	9	2	0	0	0	22,2%	0%	9	0	100%
Vac. tipo 2B ...	9	3	0	0	0	33,3%	0%	9	0	100%
Vac. tipo 3A ...	9	1	2	0	1	11,1%	33,3%	6	2	44,4%
Vac. tipo 3B ...	9	1	2	0	0	11,1%	22,2%	7	2	55,5%
Vac. tipo 4A ...	9	0	0	0	0	0%	0%	9	7	22,2%
Vac. tipo 4B ...	9	0	1	0	0	0%	11,1%	8	0	88,8%
Vac. tipo 5A ...	9	0	0	0	0	0%	0%	9	0	100%
Vac. tipo 5B ...	9	0	0	0	0	0%	0%	9	0	100%
Testemunhos ...	—	—	—	—	—	—	—	9	9	0%

A TABELA 2 resume as observações sôbre a influência da clorofila na vegetação:

TABELA 2

Tipo 1: cultura em Caldo Hottinger levedo glicose vitamina B 1 acrescentando-se clorofila hidrossolúvel antes da semeadura.

Tipo 2: idêntica a 1 sòmente que a clorofila hidrossolúvel é juntada após o crescimento antes de acrescentar o formol.

Tipo 3: cultura em Caldo Hottinger levedo glicose Vitamina B 1 acrescentando-se clorofila insolúvel em água antes da semeadura.

Tipo 4: idêntica a 3 sòmente que a clorofila insolúvel em água é juntada após o crescimento antes de juntar o formol.

	Aspecto da cultura ao exame microscópico	Contagem do n.º de germes por cm³, em placa (em milhões)
Tipo 1	morfologia uniforme	2.000
Tipo 2	morfologia muito uniforme	2.005
Tipo 3	morfologia regular	900
Tipo 4	morfologia muito uniforme	1.200

Conforme se verifica, a cultura tipo 2 apresenta as melhores características. A clorofila hidrossolúvel é tambem denominada clorofilina por GANDOLFO, MAROTTA, D'AMORE e ACCASCINA, (3).

Verificamos também que a clorofila pode exercer ligeira ação impediente, quando acrescentada ao meio de cultura antes da semeadura. Esta ação impediente torna-se sensível no caso de se usar a clorofila insolúvel em água.

ENSAIOS DE INOCUIDADE DA CLOROFILA NAS VACINAS

Verificada a possibilidade da clorofila neutralizar a ação tóxica da endotoxina das salmonelas no caso da vacina não borbulhada e verificada a possibilidade da clorofila ser acrescentada à cultura, resolvemos então observar se a vacina borbulhada clorofilada seria bem tolerada em altas doses no camondongo.

Resolvemos também na mesma prova ensaiar uma vacina borbulhada clorofilada preparada no mesmo tipo de meio de cultura, sòmente substituindo a água de levedo pelo extracto de levedo.

As vacinas foram injetadas em camondongos, por via subcutânea nas doses de 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 e 1,5 cm³ (20/10/1953).

As doses infectantes para a prova foram de 0,100, 0,050, 0,035 e 0,015 cm³, por via intraperitonial, inclusive nos testemunhos, 21 dias após a vacinação (10/11/1953).

Foram anotadas as características das culturas, as reações tóxicas após a injeção das vacinas e o poder de proteção após uma inoculação infectante.

Os resultados figuram na TABELA 3:

TABELA 3

Vacina A = cultura borbulhada em Caldo Hottinger + agua de levedo + glicose + B 1 + clorofila.

Vacina B = cultura borbulhada em Caldo Hottinger + extrato de levedo + glicose + vitamina B 1 + clorofila.

Dose infectante = mistura em partes iguais de culturas ativas de 5 amostras de *Salm. dublin.* Cultura de 20 horas em Caldo Hottinger simples a 37°C.

Foram usados 320 camondongos nesta prova, divididos em grupos e sub-grupos.

		Tipos														
		A							B							
	pH inicial 7,2	7,4							7,4							
	Turvação Escala de MacFarland	9							10							
	Contagem do n.º de germes em placa (em milhões)	2.320							2.580							
	Doses de vacina em cm3	0,1	0,2	0,4	0,8	1,0	1,2	1,5	0,1	0,2	0,4	0,8	1,0	1,2	1,5	
	Acidentes toxicos observados	Nenhum dos vacinados apresentou reação toxica geral ou local. Apenas foi observado nos que receberam doses mais altas, notadamente nos de 1,5 cm³, um certo estado de letargia durante algumas horas, desaparecendo sem sequelas. Atribui-se isto ao grande volume de líquido injetado em relação ao tamanho do corpo dos camondongos.														Testemunhos
Vacina	Doses infectantes em cm³ 0,100	5/2	5/4	5/1	5/2	5/1	5/0	5/0	5/3	5/3	5/0	5/0	5/2	5/1	5/0	10/10
	Doses infectantes em cm³ 0,050	5/3	5/1	5/0	5/0	5/1	5/1	5/0	5/2	5/2	5/0	5/1	5/0	5/0	5/0	10/10
	Doses infectantes em cm³ 0,035	5/0	5/2	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/1	5/0	5/1	5/0	5/0	5/0	5/0	10/10
	Doses infectantes em cm³ 0,015	5/0	5/1	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/1	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	10/10
	Totais	140/19							140/17							40/40
	Sobreviventes	86,4%							87,8%							0%
		numerador = vacinados							denominador = mortos							

Analizando-se a tabela verifica-se que ambas as vacinas são perfeitamente toleradas pelos camondongos mesmo em doses muito altas.

As características das culturas e o poder protetor mostram-se ligeiramente favoráveis às vacinas preparadas em meio que contenham extrato de levedo, ao invés de água de levedo.

Todavia, considerando-se a finalidade prática, é de se julgar, dadas as diferenças pouco significativas, que o uso da água de levedo ou do extrato de levedo dependeria apenas de maior ou menor facilidade no preparo de uma ou outra, de acôrdo com as condições de trabalho.

Uma vez que as vacinas borbulhadas clorofiladas são bem toleradas pelo camondongo sem sofrer alterações em seu poder de proteção é interessante que se adote na rotina de preparo deste tipo de vacina, a junção da clorofila.

Assim sendo na técnica de preparo da Vacina borbulhada, descrita em trabalho anterior (1) seria introduzido o seguinte adendo: após o borbulhamento acrescentar ao meio de cultura 8 cm^3 por litro de uma solução aquosa de clorofila hidrossolúvel a 2,5% (esterilizada por filtração). Agitar bem, deixar agir 15 a 20 minutos e em seguida junta-se 3 a 4°/oo de formalina e continuar o processo conforme a descrição.

A proporção de clorofila escolhida neste trabalho foi arbitraria e em vista dos resultados obtidos não houve preocupação em estudar outras concentrações.

Cumpre acrescentar, que no caso especial da vacina borbulhada, pelas razões expostas no início deste trabalho a junção da clorofila não é indispensável, ficando seu uso subordinado ao critério do técnico e de acôrdo com as condições de trabalho.

Após a conclusão destas observações, as Vacinas borbulhadas clorofiladas foram usadas na prática de campo em bezerros, eqüinos, suinos e aves sem que fossem notadas quaisquer perturbações que pudessem ser atribuidas a endotoxina das salmonelas ou a propria clorofila.

Desde Outubro de 1955 êste tipo de vacinas entrou na rotina de produção do Instituto Biológico de São Paulo, tendo sido preparadas e entregues aos criadores: Vacina contra o Paratifo dos bezerros (*Salm. dublin*), Vacina contra o Aborto eqüino (*Salm. abortivoequina*), Vacina contra o Tifo aviário (*Salm. gallinarum*), Vacina contra o Paratifo dos leitões (*Salm. choleraesuis* e *Salm. kunzendorf*), todas pela mesma técnica, sem que até o presente chegasse ao nosso conhecimento qualquer reclamação sobre a toxidez ou a falta de proteção destes produtos.

CONCLUSÕES

1 — As experiências efetuadas mostram que a clorofila pode neutralizar os efeitos das endotoxinas presentes nas culturas de salmonelas.

2 — As vacinas obtidas das culturas assim tratadas são inócuas, não provocando reações desagradaveis locais ou gerais, quando injetadas em camondongos.

3 — Acrescentada após o crescimento da cultura e antes da junção do formol, a clorofila hidrossolúvel não afeta a proteção da vacina.

4 — A clorofila, notadamente a clorofila não solúvel em água, possue ligeira ação impediente se acrescentada ao meio de cultura antes da semeadura do germe.

5 — No caso especial das vacinas borbulhadas, embora não pareça ser necessário juntar a clorofila, verifica-se que não há desvantagem em seu emprego. Um resquício de toxidez, notado, às vezes, apenas quando se usa dose muito alta (4 a 6 vezes a dose necessária), é eliminado ao se tratar culturas com a clorofila.

BUBBLING TECHNIQUE IN THE PREPARATION OF VACCINES

IV — STUDIES ON THE EFFECT OF CHLOROPHYLL ON THE ENDOTOXINS OF *SALMONELLA* AND ITS USE IN BUBBLED VACCINES

A b s t r a c t

As shown by study and experimentation, chlorophyll neutralizes the endotoxins present in S a l m o n e l l a e cultures.

Vaccines obtained from cultures subjected to this treatment are innocuous, producing no unpleasant general or local reaction when injected into mice.

Water-soluble chlorophyll does not affect the protective power of the vaccine when added before formalin, after the culture growth.

Chlorophyll, especially insoluble chlorophyll, exerts a slight impedient effect when it is added to the culture medium before inoculating the organism.

In the special case of bubbled vaccines, although it is not necessary to add chlorophyll, there is no disadvantage in its use. A remnant of toxicity, which is observed only when a very high dose is used (4 to 6 times the necessary dose) is eliminated when cultures are treated with chlorophyll.

BIBLIOGRAFIA

1) Cury, R. e Troise, C. — 1957 — Técnica de Borbulhamento no Preparo de Vacinas. I. Estudos sôbre vacinas contra infecções por *Salmonella dublin*. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo,* 24 (1): 1-34.

2) Cury, R. e Troise, C. — 1957 — Técnica de Borbulhamento no Preparo de Vacinas. II. Estudos sôbre vacinas contra infecções por *Salm. abortivoequina, gallinarum, choleraesuis* e *kunzendorf*. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo,* 24 (2): 35-45.

3) Gandolfo, N., Marotta, U., D'Amore, A. e Accascina, G. — 1953 — Azione della clorofilina sull'organismo animale — Nota preliminare. *Rendiconti* Inst. Superiore di Sanitá, Roma, **16** (10/11/12): 840-843.

4) Hutner, S. H. and Zahl, P. A. — 1942 — The action of sulfanilamide compounds on the lethal factor of bacterial toxins. *Science,* **96** (2503): 563-564.

5) Ribeiro, F. e Lacerda Jr., P. M. G. — 1950 — Neutralização da toxina tetanica pelo clorofila hidrossolúvel. *Rev. Fac. Med. Vet. Univ. S. Paulo,* 4 (2): 251-256.

6) Troise, C. e Cury, R. — 1957 — Técnica de Borbulhamento no Preparo de Vacinas. III — Experiências de campo com vacinas borbulhadas contra Salmoneloses. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo,* 24 (3): 47-60.

7) Zahl, P. A. and Hutner, S. H. — 1942 — Action of bacterial toxins on tumors. II. Effect of Sulfanilamide on toxin-induced hemorrhage. *Proceed. Soc. Exp. Biol. and Med.,* **51** (2): 285-287.

8) Zahl, P. A., Drasher, M. L. and Hutner, S. H. — 1946 — Pharmacological protection against *Salmonella* endotoxin and certain other poisons. *Proceed. Soc. Exp. Biol. and Med.,* **63** (3): 550-555.

———o———

O VALÔR DO ÓLEO DE QUENOPÓDIO E DAS PLANTAS DE "ERVA DE SANTA MARIA" — *CHENOPODIUM AMBROSIOIDES, L.* VAR. *ANTHELMINTICUM* (L.) GRAY NO CONTROLE A NEMATOIDES QUE ATACAM RAIZES DE VEGETAIS CULTIVADOS (*)

POR

A. Orlando

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 2 figs. no texto e estampas 1-2

I — INTRODUÇÃO

Os nematoides constituem muitas vezes obstáculos de suma importância para o desenvolvimento de diversas culturas. Muitas das recomendações que têm sido feitas para seu controle são infelizmente de custo elevado, ou de difícil praticabilidade ou de eficiência não muito alta.

Daí necessitar de investigações mais amplas êsse setôr fitossanitário, que está exigindo novas contribuições.

Com essa finalidade, foi realizada a série de ensáios aqui descritos, procurando-se conhecer, em primeiro lugar, a atividade do óleo de quenopódio sôbre êsses parasitas de plantas.

O óleo de quenopódio, como se sabe, é largamente empregado com êxito, mesmo em nossos dias, contra alguns vermes ou parasitos humanos e de animais.

Por essa razão, pensou-se em utilizá-lo contra vermes que atacam raízes de vegetais cultivados.

Nos atuais ensáios, foram tambem incluidos testes com o conjunto de constituintes da "erva de Santa Maria", pelo emprêgo da planta toda, enterrando-a ou aproveitando-a sob a forma de extrato aquoso total.

II — LITERATURA

A literatura brasileira destaca, em algumas citações interessantes, o valor da "erva de Santa Maria", quer como repelente para vermes que atacam plantas, quer como inseticida ou inseto-repelente. Entretanto, existem apenas algumas referências esparsas sem base experimental.

(*) O nematoide encontrado em nosso campo experimental, em raizes de aboboreira, foi gentilmente identificado pelo Dr. L. G. E. Lordello, como **Meloidogyne javanica** (Treub, 1885) Chitwood, 1949 (Ord. **Tylenchida** - Fam. **Heteroderidae**), a quem agradecemos.

Nêsse sentido, destacam-se: DECKER (1), recomendando para o combate aos vermes das raízes — réga com uma decocção ou extração aquosa de "erva de Santa Maria". Em outro trabalho de divulgação, DECKER (2, 1943) diz: "Seria interessante experimentar a infusão preparada com "ervas de Santa Maria" (*Chenopodium ambrosioides*), que parece afugentar todos os insétos pelo seu amargor altamente desagradável".

HOEHNE (5, 1939), ao se referir às "ervas de Santa Maria" (*Chenopodium ambrosioides* e *C. anthelminticum*), exalta-as com as seguintes expressões: "Como inseticida se recomendam muito e estamos convencidos que o seu emprêgo como inseticida agrícola poderá trazer grandes bênçãos para a agricultura".

Assim, a referida planta tem recebido algumas referências de nossos autores, aliás muito esperançosas, relacionadas com o setor agrícola e mais ou menos com o assunto que óra é aqui desenvolvido.

De acôrdo com o "Chemical Abstracts" (vol. 11-1917 a vol. 49-1955), pode-se dizer que a literatura universal, relativamente à atividade de plantas e óleo de quenopódio sôbre diversos parasitos, é muito grande, porém não se encontrou trabalho algum relacionado diretamente com o aspéto focalizado neste ensáio.

Numerosas citações existem, porém referentes à composição das plantas e óleo de quenopódio, à toxicidade de seus constituintes, terapeutica, etc., com aplicação principalmente sôbre vermes que atacam animais e homem.

Quanto ao aspéto em estudo, nada tambem foi encontrado em "Chemical Abstracts", apenas se conhecem alguns trabalhos relativos à atividade do óleo e extratos em geral sôbre insétos, minhócas, carpas — FELICIANO GUIMARÃES (4, 1927), REINDOLLOR, et al. (7, 1931), SIEVENS, et al. (8, 1949), AKIRA HONNO, et al. (6, 1953). Não foi possivel consultar-se, entretanto, o trabalho de FREISE (3, 1937), que fornece informação sôbre o que se fez, de modo geral, com o óleo de quenopódio, nos últimos 15 anos.

De posse de todas essas citações e conhecimentos, pareceu interessante realizar os ensáios aqui descritos, ainda que sua conclusão não coincida com idéias e esperanças de alguns pesquizadores.

III — TÉCNICA E MATERIAL

Realizaram-se três diferentes tipos de ensáios, dois nas condições de campo e um em vasos.

As experiências de campo foram realizadas no "Campo experimental do Instituto Biológico" (Ibirapuera), onde o Dr. Moysés

Kramer, da Seção de Fisiologia Vegetal Aplicada, informou existir uma grande mancha de terreno, com elevada infestação de nematoides.

Para os testes em vasos, foram utilizados, como fontes, tomateiros intensamente atacados por nematoides, gentilmente enviados da Fazenda "Limeira" — Ribeirão Preto, pelo Dr. J. ABRAHÃO, da Seção de Fitopatologia Geral.

A) *ENSAIOS PRELIMINARES NO CAMPO*

Para êsses primeiros ensáios, foram separados, na citada mancha dêsse campo experimental, 8 talhões, cujas dimensões, espaçamentos e outras características estão representadas na Fig. 1.

Ainda por sugestão do Dr. KRAMER, usou-se a aboboreira como planta indicadora. Esta é uma planta que, ao ser cultivada em sólos infetados por nematoides, indica no menor tempo possível, a presença desses parasitos, como que atraindo-os e demonstrando sua existência pelas inúmeras e volumosas nodosidades que apresenta em suas raizes.

A variedade de aboboreira empregada foi a "Moranga".

As plantas de "erva de Santa Maria" empregadas foram semeadas em caixas, em 20/7/55, e transplantadas para o campo em 16/9/55. Essas mudas possuiam, nessa ocasião, 4-5 fôlhas e mais ou menos 9-10 cm. de altura.

As sementes de aboboreira foram semeadas diretamente no campo, em 18/10/55, estando, nessa ocasião, as plantas de "erva de Santa Maria", com um palmo e meio de altura.

Os tratamentos aplicados foram os seguintes: nos lotes A1, A2, A3 e A4 (Fig. 1), além das plantas de abóbora, foram cultivadas, entre as linhas, plantas de "erva de Santa Maria". Nos lotes A1 e A3, as plantas de abóbora permaneceram simplesmente entre as fileiras das plantas de quenopódio, para se verificar se esta simples disposição já produziria uma certa proteção. Nos lotes A2 e A4, o tratamento foi idêntico ao A1 e A3 até 7/XI/55, quando as plantas de abóbora apresentavam duas folhinhas verdadeiras em formação e, então, as de "erva de Santa Maria", com sementes tambem em formação e mais ou menos 60 cm de altura, foram cortadas e enterradas ao correr das linhas da aboboreira. Isto foi feito para se verificar se havia proteção às plantas de abóbora, por parte dos constituintes totais da "erva de Santa Maria", em relação ao ataque de nematoides.

O sólo do lote B1 (só aboboreira), foi tratado com pulverização de extrato aquoso, de "erva de Santa Maria". Êste tratamento foi repetido duas vezes, no decorrer da cultura. O primeiro foi apli-

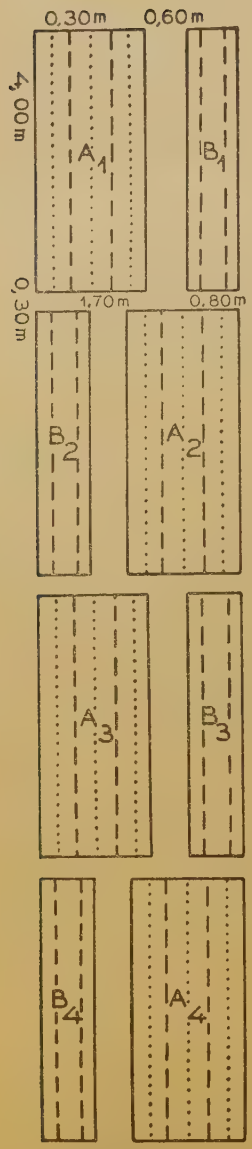


Fig. 1 — Esquema do campo montado para realização dos ensáios preliminares. (A)

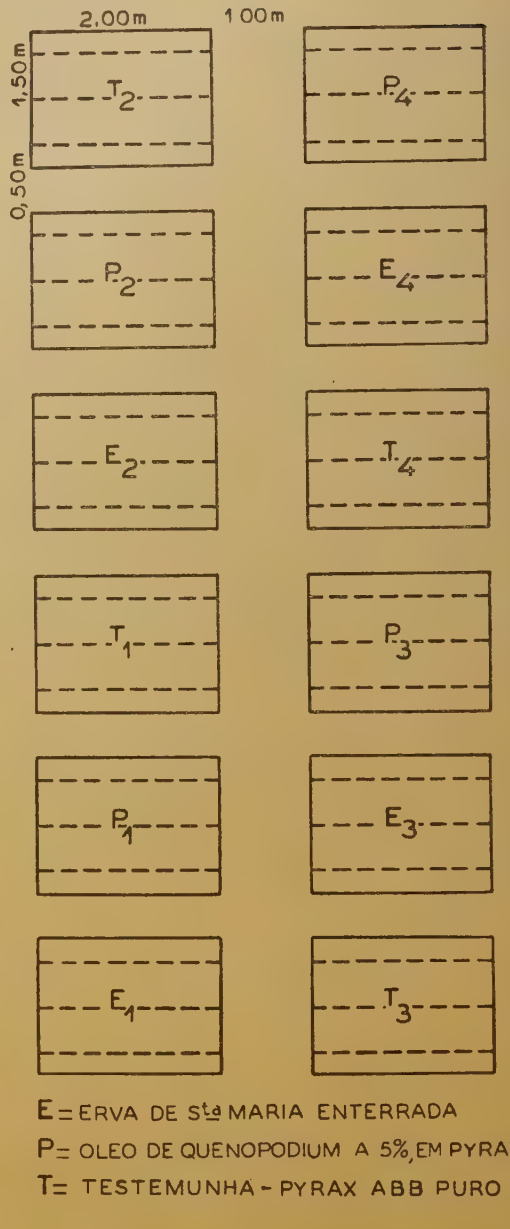


Fig. 2 — Esquema do campo experimental de abóbora, montado para realização dos ensáios finais. (C).

cado no início, isto é, quando as plantas de abóbora possuiam duas fôlhas cotiledonares e uma verdadeira já formada, e o segundo, 15 dias após o primeiro.

O suco para êsses tratamentos foi obtido na base de 2 kg. de fôlha e hastes frescas, bem trituradas, para 4 lt. de água, em maceração por 24 horas, sofrendo, depois, prensagem e filtração. O gasto de líquido, por aplicação, foi de 3 lt/3,2m², portanto, um tratamento bem intenso.

O sólo do lote B3 (só aboboreira) foi tratado com óleo de quenopódio, absorvido em Pyrax AAB a 1%. (*). Os tratamentos foram repetidos duas vezes e aplicados na mesma ocasião que o de B1. O gasto de pó, por aplicação, foi de 192 gr/3,2m², portanto, tambem bem intenso.

Os lotes B2 e B4 (só aboboreira) foram utilizados como testemunhas e receberam tambem, duas vezes, Pyrax ABB puro, na base do lóte B1.

A colheita ou arrancamento das plantas de abóbora foi iniciado em 28/11/55, portanto um mês e 10 dias depois do plantio.

B) *ENSAIOS COM PLANTAS EM VASOS*

Como planta teste, foi empregado o tomateiro da variedade "Santa Cruz", que é tambem muito sensível e muito atacada por nematoides.

Os tratamentos empregados foram os seguintes:

1 — Mistura ao sólo de Pyrax ABB, contendo 1% de óleo de quenopódio, em 5 aplicações (Série 1) ou em número de 4 (Série 2), repetidos semanalmente.

2 — Testemunha, mistura ao sólo de Pyrax ABB puro, em 5 aplicações, tambem semanais (Série 3).

Foram utilizados 5 vasos em cada série, todos cheios com terra esterilizada. Cada vaso de 21 cm de diâmetro e 22 cm de altura, foi infectado, em sua parte central, com 2 ou 3 fragmentos de raizes de tomateiros apresentando inúmeras nodosidades típicas. Ao redor dêsses fragmentos, foram plantadas, na mesma ocasião, as mudinhas de tomateiro da var. "Sta. Cruz" sadias, cultivadas em estufa, possuindo, então, mais ou menos 10 cm de altura e em número de 3 para cada vaso.

(*) Produto fornecido pelo Instituto Pinheiros — Produtos Terapeuticos S. A., a cuja direção externamos nossos agradecimentos.

Os pós foram misturados à terra na base de 6 gr por vaso e por aplicação, portanto, bem intensamente tratados.

O plantio foi realizado em 6/12/55 e a coléta dos dados, em 11/1/56, tendo, assim, decorrido 1 mês e 5 dias da instalação do ensáio.

C) *ENSAIOS FINAIS NO CAMPO*

Com o fim de chegar a um resultado mais conclusivo, êstes últimos ensáios, foram realizados no campo, com um número razoavel de repetições e tambem com maior número de plantas.

A disposição dada ao campo, as dimensões, o número de linhas, etc. estão representados na Fig. 2.

Como planta teste, usou-se a abóbora var. "Moranga". Cada lóte comportou 3 fileiras de abóbora. Esta foi semeada em 14/12/55 e o arrancamento procedido em 30/1/56; portanto, depois de um mês e 16 dias do plantio.

Os tratamentos aplicados foram os que se mostraram mais promissores nos ensáios anteriores (A), assim:

E — Plantas de "erva de Santa Maria", enterradas nos canteiros correspondentes, um dia antes da semeadura das aboboreiras. O gasto por canteiro foi de 4.200 kg de fôlhas e hastes frescas, o que permitiu uma cobertura total.

P — Aplicação do óleo de quenopódio absorvido em Pyrax ABB e na dosagem bem mais elevada de 5%. Número de aplicações, por canteiro: 4 — Aplicação cada 10-12 dias. Gasto por canteiro e por aplicação: 190 gr/3m².

T — Testemunhas — Pyrax ABB puro. Os demais dados iguais a P.

IV — RESULTADOS GERAIS

Para determinar a intensidade do ataque, quer no campo quer em vasos (Ensáios A, B e C), deu-se, para cada planta colhida, uma nota, de 0 a 4, de acôrdo com a existência de maior ou menor número de nodosidades nas raizes.

Para a computação final dos resultados foi ainda mais concentrada essa escala, reunindo-se os dados nas 3 categorias seguintes:

0 — Plantas sem ataque.
1 e 2 — Plantas pouco atacadas.
3 e 4 — Plantas muito atacadas.

As estampas 1 e 2 ilustram bem essa escala convencional, onde se vêm, em 1a — raizes sem ataque; em 1b e c — raizes representantes da categoria de pouco atacadas e, em 1d, um exemplo das que foram tidas como raizes muito atacadas.

De acôrdo com essa convenção, foram resumidos em tabelas os dados colhidos nos três diferentes ensáios. A tabela 1 mostra os dados relativos aos ensáios preliminares de campo (A), onde se pode verificar que os melhores resultados foram obtidos com a aplicação do pó contendo 1% de óleo de quenopódio e com o enterrio da "erva de Santa Maria", com porcentagens respectivas de 55 e 83,7 de plantas não atacadas, enquanto que, para as testemunhas, êsse valor foi de apenas 38,8%. Os demais tratamentos não demonstraram qualquer evidência de atividade quanto à redução de ataque.

Êsse ligeiro ensáio preliminar, veio, assim, mostrar alguma possibilidade para aquêles dois tratamentos, o que induziu ao prosseguimento da experimentação, aplicando-os em outros ensáios, nas condições de campo e em vasos, com maior número de plantas e repetições.

Os dados relativos aos ensáios (B), em vasos, estão condensados na Tabela 2. Aqui diferentemente do que foi observado em (A), não se nota uma vantagem muito distinta para os tratamentos em que se utilizou o óleo de quenopódio a 1%, absorvido em Pyrax ABB. Tanto os vasos testemunhas como os tratados (4 ou 5 aplicações) se apresentaram sem plantas não atacadas e com alta porcentagem de plantas muito atacadas.

A Tabela 3 mostra os resultados conseguidos nos ensáios finais de campo (C). Verifica-se, assim, que os dois tratamentos empregados provocaram apenas uma diminuta diferença entre o número de plantas não atacadas, em relação às testemunhas, sendo esta redução da ordem de sómente 3,6 a 4,4%.

Considerando-se o ensáio preliminar (A), em que se utilizou um número bem menor de plantas e de repetições, com o emprêgo de uma distribuição irregular dos tratamentos e baseando-se nos dois últimos grupos de ensáios (B) e (C), realizados com um maior número de plantas e de repetições e com melhor distribuição dos tratamentos, impõe-se concluir pela ineficácia, contra os nematoides testados, do óleo de quenopódio (1 a 5%) e das plantas de "erva de Santa Maria", plantadas entrelinhas ou enterradas e de seu extrato aquoso, usados nas dosagens e condições dêsses ensáios.

TABELA 1

Tratamentos	Repetição	Número de Plantas			
		Testadas	Pouco atacadas	Muito atacadas	Não atacadas
Plantio entre linhas	1	17	10	6	1
	2	19	4	7	8
	N.º total	36	14	13	9
	Porcentagem	—	38,8	36,1	25,0
Extrato aquoso	1	23	12	9	2
	Porcentagem	—	52,1	39,1	8,6
Planta enterrada	1	18	3	3	12
	2	25	1	0	24
	N.º total	43	4	3	36
	Porcentagem	—	39,0	6,9	83,7
Pó a 1%	1	20	5	4	11
	Porcentagem	—	25,0	20,0	55,0
Testemunha	1	16	5	4	6
	2	20	7	5	8
	N.º total	36	12	9	14
	Porcentagem	—	33,3	25,0	38,8

Resultados conseguidos nos ensáios preliminares de campo (A), com a aplicação de diferentes tratamentos, para o controle de nematoides

TABELA 2

Tratamentos	Repetição	Número de Plantas			
		Testadas	Pouco atacadas	Muito atacadas	Não atacadas
Série 1 Pó a 1% (5 aplicações) (1 aplicação antes do plantio)	1	3	0	3	0
	2	3	1	2	0
	3	3	0	3	0
	4	3	0	3	0
	5	3	2	1	0
	N.º total	15	3	12	0
	Porcentagem .	—	20,0	80,0	0
Série 2 Pó a 1% (4 aplicações)	1	2*	0	2	0
	2	2*	2	0	0
	3	3	1	2	0
	4	3	0	3	0
	5	3	0	3	0
	N.º total	13	3	10	0
	Porcentagem .	—	23,0	76,9	0
Série 3 Testemunha Pyrax ABB (5 aplicações)	1	3	0	3	0
	2	3	1	2	0
	3	3	0	3	0
	4	3	0	3	0
	5	3	1	2	0
	N.º total	15	2	13	0
	Porcentagem .	—	13,3	86,6	0

* Morta com bacterióse

Resultados obtidos nos ensáios de controle de nematoides, em vasos (B)

TABELA 3

Tratamentos	Repetição	Número de Plantas			
		Testadas	Pouco atacadas	Muito atacadas	Não atacadas
Erva enterrada	E 1	41	15	26	0
	E 2	43	20	20	3
	E 3	50	16	21	13
	E 4	50	16	29	5
	N.º Total	184	67	96	21
	Porcentagem .	—	36,4	52,1	11,4
Pó a 5%	P 1	44	17	26	1
	P 2	48	12	30	6
	P 3	48	20	20	8
	P 4	47	19	20	8
	N.º Total	187	68	96	23
	Porcentagem .	—	36,4	51,3	12,2
Testemunha Pyrax ABB	T 1	47	13	34	0
	T 2	45	24	18	3
	T 3	49	13	36	0
	T 4	47	23	12	12
	N.º Total	188	73	100	15
	Porcentagem .	—	38,8	53,2	7,8

Resultados finais da experimentação em campo, relativos ao controle de nematoides pelos tratamentos já descritos (C)

THE EFFICIENCY OF THE OLEUM CHENOPODII AND OF EXTRACTS OF THE WORMSEED PLANT-*CHENOPODIUM AMBROSIOIDES*, L. VAR. *ANTHELMINTICUM* (L.) GRAY. — FOR THE CONTROL OF ROOTBORERS

Abstract

We performed the experiments described in this paper with the purpose to find out, whether or not aqueous extracts, total constituens or oil (1-5% powder, in Pyrax ABB) of the wormseed plant — Chenopodium ambrosioides, L. var. anthelminticum (L.) Gray, are efficient when used in soil as repellents against the root borer Meloidogyne javanica (Treub, 1885) Chitwood, 1949, which attacks the roots of some crops causing heavy losses.

In spite of the favorable opinions of some authors on the efficiency of such extracts, we verified, that soil treatments, applied under the conditions described in this paper, on plant grown in the field or in flower pots, gave no satisfactory results.

We attributed this first to the volatility of some constituents of the wormseed plant. Therefore we set up new series of experiments, submitting the test plants (pumpkin and tomato) to periodic, sometimes weekly, treatments. Even so, the results of our experiments were not encouraging.

BIBLIOGRAFIA

1) Decker, J. S. — Flores no lar. Edições Melhoramentos — *Criação e Lavoura* — N.º 12 — 152 pp.

2) Decker, J. S. — 1943 — Conselhos práticos para a cultura das hortaliças — *Publicação da Diretoria de Publicidade Agrícola* — Secretaria da Agricultura do Estado de S. Paulo — 170 pp.

3) Freise, F. W. — 1937 — Oleum chenopodii anthelmintici. *Pharm. Ztg.* 82, 1023-24.

4) Guimarães, F. — 1937 — Action of essence of chenopodium on earthworms. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 96, 1249-50.

5) Hoehne, F. C. — 1939 — Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Departamento de Botânica do Estado de S. Paulo. 355 pp.

6) Honno, A., et al. — 1953 — Insect repellent. Japan, 5897 - Nov. 14.

7) Reindollor, W. F. and J. C. Munch — 1931 — A comparison of the chemical and biological assays of oleum chenopodii. *J. Am. Pharm. Assoc.* 20, 443-5.

8) Sievens, A. F. et al. — 1949 — Insecticidal tests of plants from tropical America. *J. Econ. Entomol.* 42: 549-51.

9) ———— *Chemical Abstracts.* Vol. 11-1917 a Vol. 49-1955.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampas 1-2

Raizes de aboboreira representantes dos diferentes grupos, com intensidades variaveis de ataque pelo nematoide em estudo.

Fig. 1a — Raizes sem ataque — Nota O.

Fig. 1b e 1c — Raizes pouco atacadas — Notas 1-2.

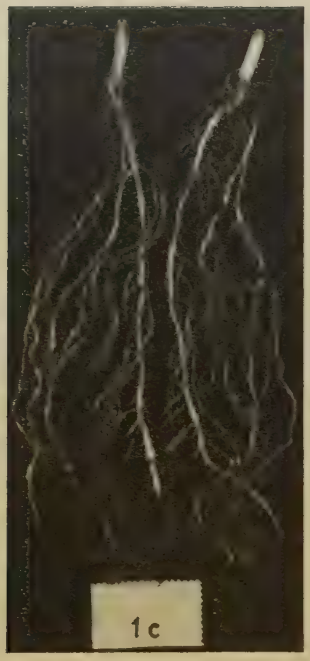
Fig. 1d — Raizes muito atacadas — Notas 3-4.

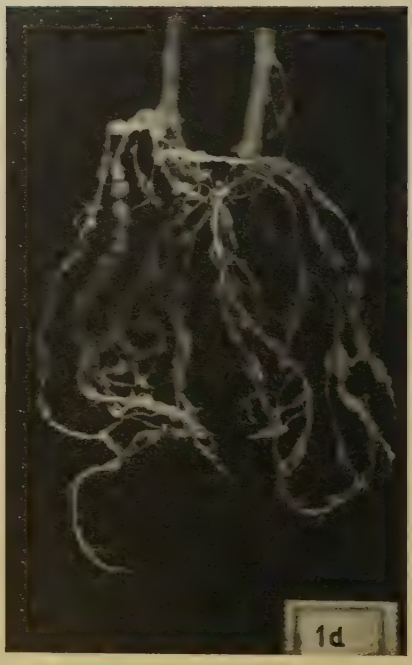
(Fotos-Vicente).

———o———

1a

1b


1c


1d

ESPECTROS U. V. DOS PRODUTOS DA DECOMPOSIÇÃO ESPONTÂNEA DO ÁCIDO INDOLPIRÚVICO (*)

POR

Käthe Schwarz (**)

Do Centro de Estudos sôbre o Cancer dos Vegetais
do Instituto Biológico de São Paulo

Com 5 figuras no texto

No decorrer de estudos sôbre a decomposição espontânea de derivados indólicos (SCHWARZ e BITANCOURT, 1957[1]) o problema da identificação dos produtos dessa decomposição nos levou a procurar caracterisa-los pelo seu espectro de absorpção no ultra-violeta. Nêsse empreendimento tivemos a boa sorte de contar com o valioso auxílio do Prof. STAMMREICH, da Cadeira de Física Superior, da Universidade de São Paulo, que não somente pôs à nossa disposição as facilidades de seu laboratorio de espectroscopia como nos auxiliou constantemente na preparação dos espectrogramas e muito especialmente na interpretação dos resultados (2).

MATERIAL E MÉTODO

O ácido indolpirúvico que empregamos nos foi gentilmente cedido pelo Dr. K. V. THIMANN. Este produto foi sintetisado pelo Dr. A. EK e acha-se na forma enólica. Seu ponto de fusão é 211-213°. E' um pó amorfo, de coloração clara amarelada, que se dissolve com dificuldade na água, dando uma solução incolor. Dentro de poucas horas, entretanto, esta solução se decompõe espontaneamente, adquirindo coloração amarela e finalmente côr de laranja.

No trabalho citado acima estão descritos os métodos empregados para a separação dos diversos produtos da decomposição por cromatografia em papel, e para a detecção dos mesmos, quer diretamente nos cromatogramas, graças à fluorescência desses produtos ou às reações coloridas com diversos reagentes, quer por meio de "spot-tests" em placa de porcelana das soluções eluidas destes cromatogramas.

(*) Recebido para publicação a 30 de janeiro de 1957.
(**) Bolsista de pesquisas do Conselho Nacional de Pesquisas.
(1) Schwarz, K., & Bitancourt, A. A. A decomposição espontânea de alguns derivados indólicos. I Ácido indolpirúvico. Arq. Inst. Biol., vol. 24, art. 14.
(2) Parte do equipamento utilisado no presente trabalho foi doado pela Fundação Rockefeller. A autora agradece ao Dr. A. A. Bitancourt pelo auxílio prestado na redação do presente trabalho, ao Professor H. Hauptmann por críticas e sugestões no decorrer de sua execução, e ao Dr. K. V. Thimann pela amóstra de ácido indolpirúvico, assim como por ter comunicado o resultado de trabalhos não publicados de seu laboratório, de autoria de B. Stowe.

O presente trabalho descreve os espectrogramas obtidos com os produtos eluidos dos "spots" ou zonas 2, 3, 4, 5, 6_1, 6_2 e 7 (loc. cit) de cromatogramas a uma ou duas dimensões, preparados a partir de soluções de ácido indolpirúvico, diretamente ou após fracionamento etéreo. Este fracionamento é efetuado da seguinte maneira: A um miligrama de ácido indolpirúvico dissolvido em 1 cm^3 de etanol a 50%, juntam-se 3 cm^3 de bicarbonato de sódio a 1% e sacoleja-se com 20 cm^3 de eter etílico, redistilado em presença de sulfato ferroso e hidróxido de calcio. As substâncias neutras (zonas 1, em parte, 3 e 6_1) passam para o eter. A fração aquosa, acidificada a pH 3 é novamente extraída com eter, fornecendo a fração ácida. Esta fração foi utilisada para preparar cromatogramas da zona 6_2.

A figura 1 mostra a situação dos diversos "spots" num cromatograma a duas dimensões, empregando o mesmo solvente, ou seja a agua, em atmosfera saturada de vapores de ácido acético, — nas duas direções de cromatografia. O já citado trabalho discute as vantagens do método de cromatografia dupla ou seja a cromatografia a duas dimensões empregando o mesmo solvente duas vezes, no estudo de substâncias que se decompõem espontaneamente, — ou que podem ser decompostos por agentes físicos como a irradiação ultra-violeta, no próprio papel do cromatograma, — entre a primeira e a segunda cromatografia. A figura 1A representa a distribuição dos spots depois da primeira cromatografia e a figura 1B, a sua distribuição depois da segunda cromatografia. O contorno dos spots é o das manchas fluorescentes visiveis no cromatograma à luz de uma lampada munida de um filtro que deixa passar principalmente a luz de onda de 366 mμ.

Do cromatograma representado na figura 1B, foram eluidos os "spots" 2, 3 e 4. O "spot" 6_1 foi eluido de outro cromatograma duplo, preparado com o extrato etéreo da fração neutra do ácido indolpirúvico decomposto. Este "spot" é muito fraco e não aparece na figura 1B, mas surge, com fluorescência azul clara muito forte, em cromatogramas preparados com a fração neutra total de 1 mg de ácido indolpirúvico. Os "spots" 5, 6_2 e 7 transformam-se em parte, entre a primeira e segunda cromatografia, em produtos insolúveis na agua que não circulam na segunda dimensão. Por este motivo as substâncias dêsses spots foram eluidas de cromatogramas unidimensionais. Os "spots" 5 e 7, mais fracos, foram eluidos de 3 cromatogramas. O "spot" 6_2 foi eluido de um cromatograma da fração etérea ácida do ácido indolpirúvico em que estavam bem separados os "spots" 6 e 7.

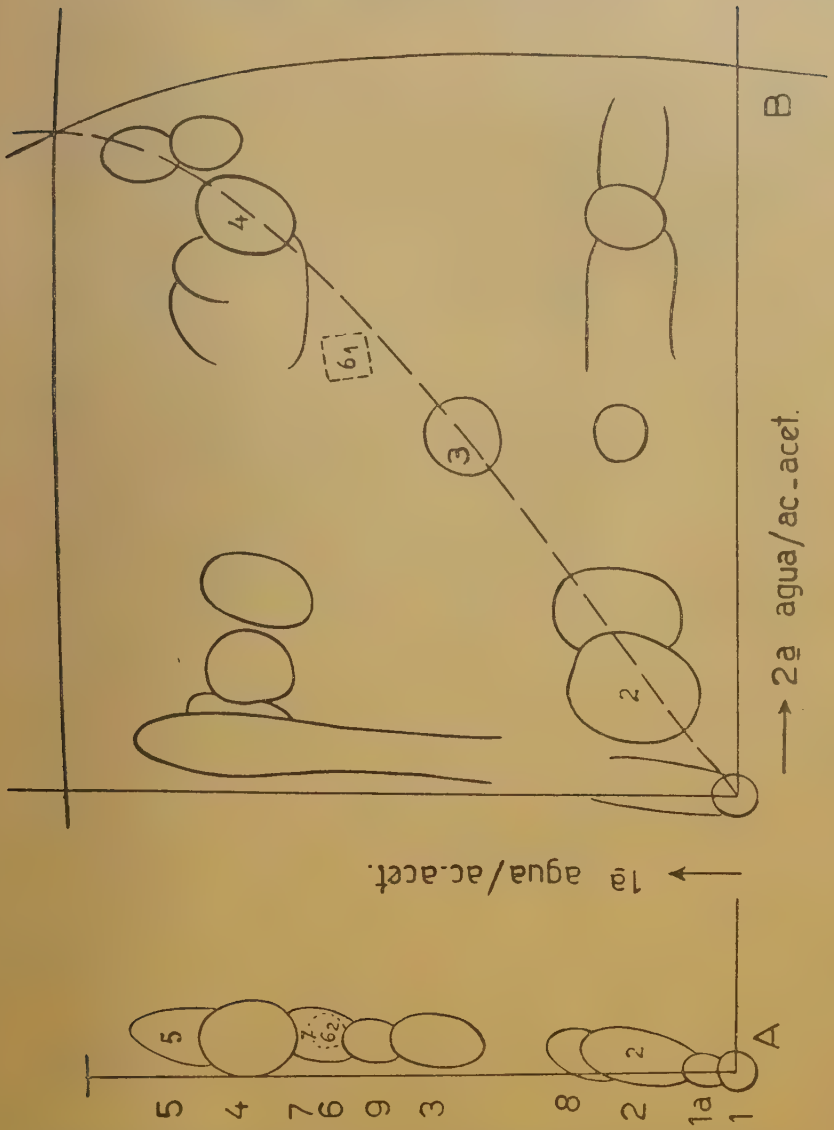


Fig. 1 — Cromatograma duplo do ácido indolpirúvico (30 μg) em que foi usada a água como solvente, nas duas direções, em atmosfera saturada de ácido acético. A. distribuição dos "spots" depois da primeira cromatografia; os "spots" 2, 5, 6_2 e 7 foram eluidos de um cromatograma semelhante, a uma dimensão. B. distribuição dos "spots" depois da segunda cromatografia; os "spots" 2, 3 e 4 foram eluidos do cromatograma representado. O "spot" 6_1 não era visível no cromatograma representado e foi eluido de um cromatograma semelhante preparado com a fração neutra de um extrato etereo de 1 mg de ácido indolpirúvico.

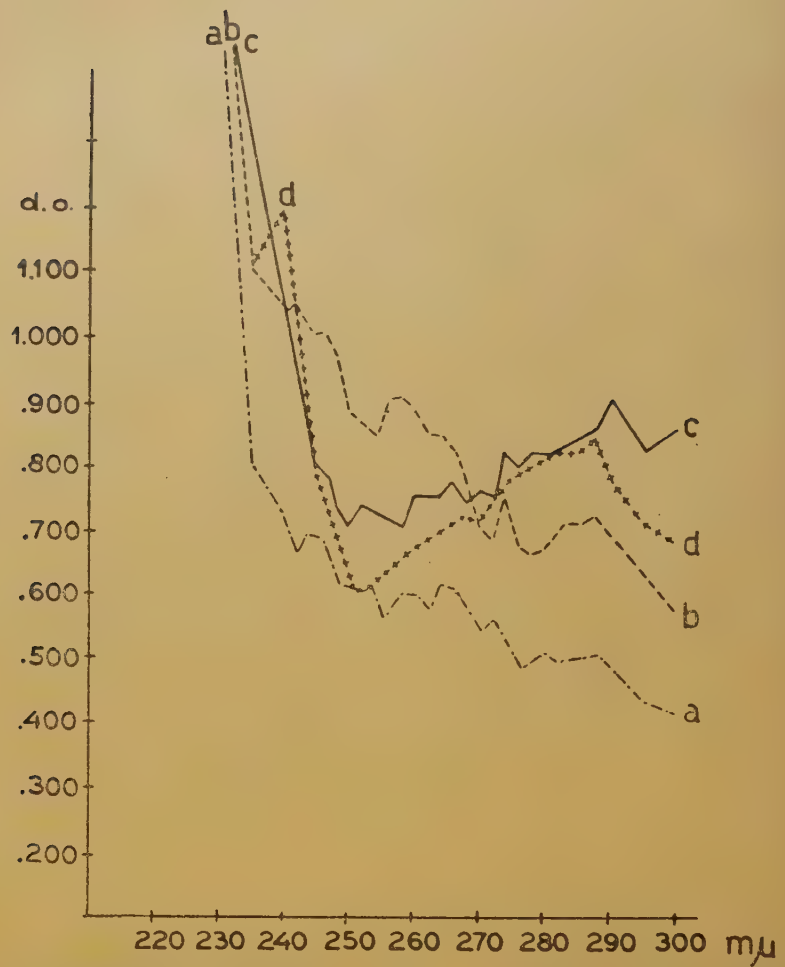


Fig. 2 — Espectros de absorção em luz U. V. de 4 eluidos diferentes do "spot" 2.

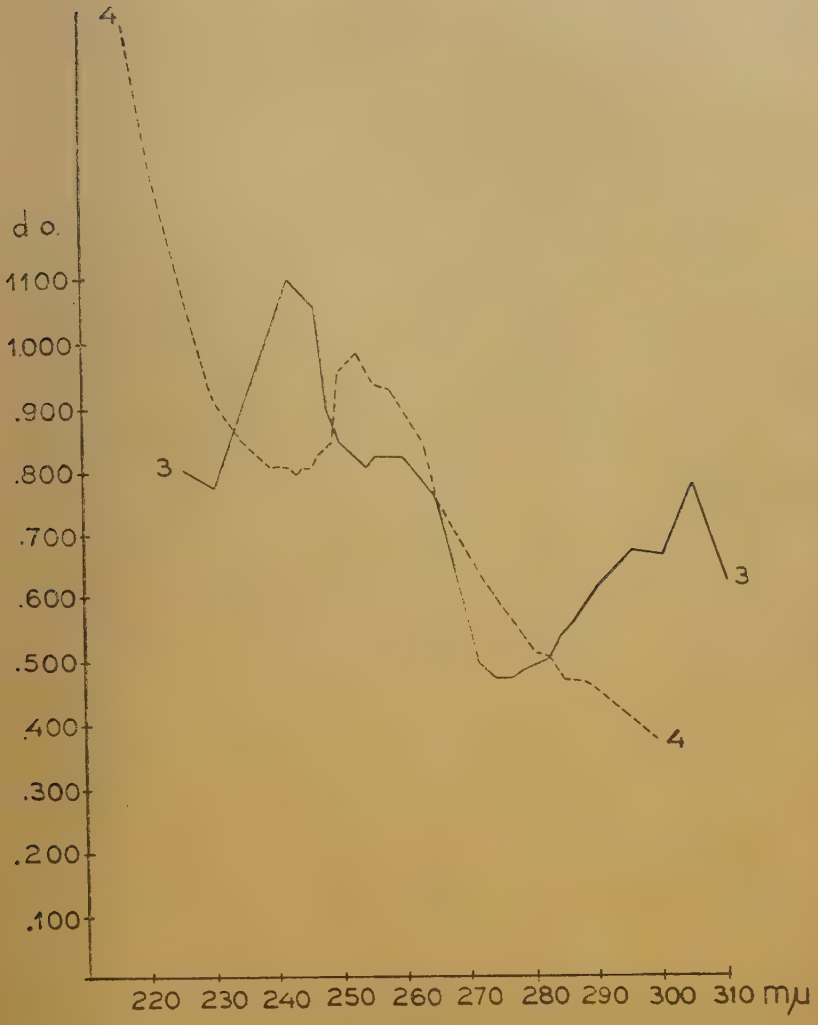


Fig. 3 — Espectros de absorção em luz U. V. dos "spots" 3 e 4.

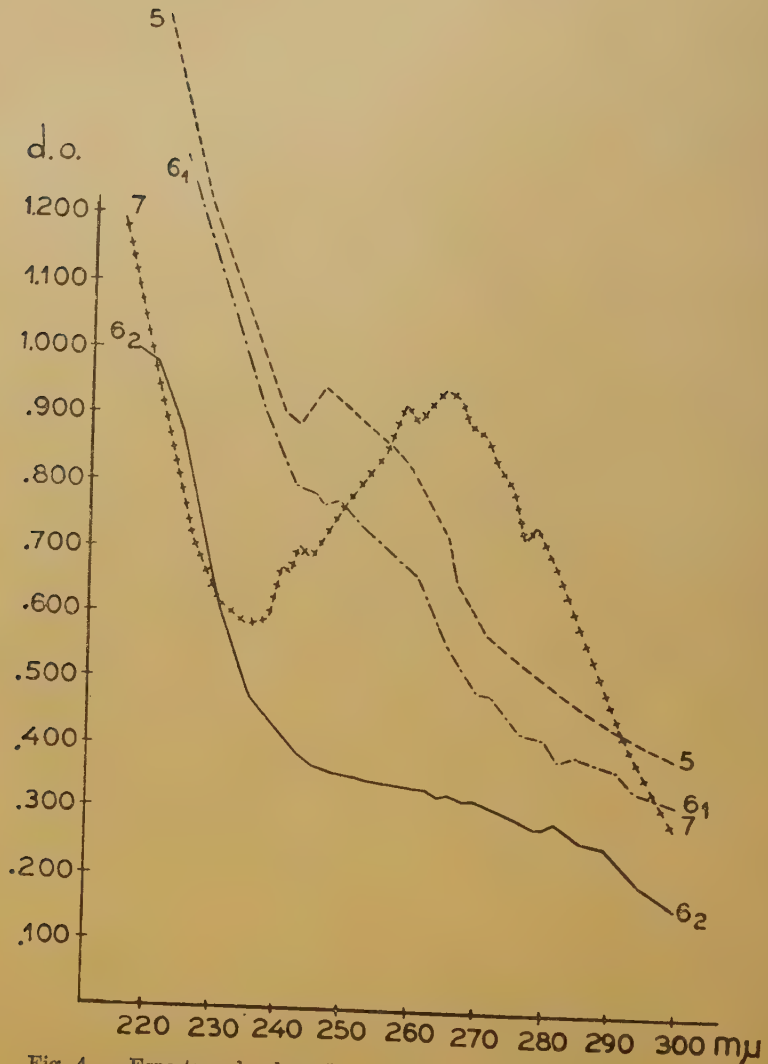


Fig. 4 — Espectros de absorção em luz U. V. dos "spots" 5, 6_1, 6_2 e 7.

A eluição dos "spots" recortados do cromatograma foi feita com 0,7 cm³ de etanol a 50% e a solução obtida foi colocada em micro-cubas de quartz de 3 mm. de largura e com caminho ótico de 10 mm. Os espectrogramas foram construidos gráficamente, a par-

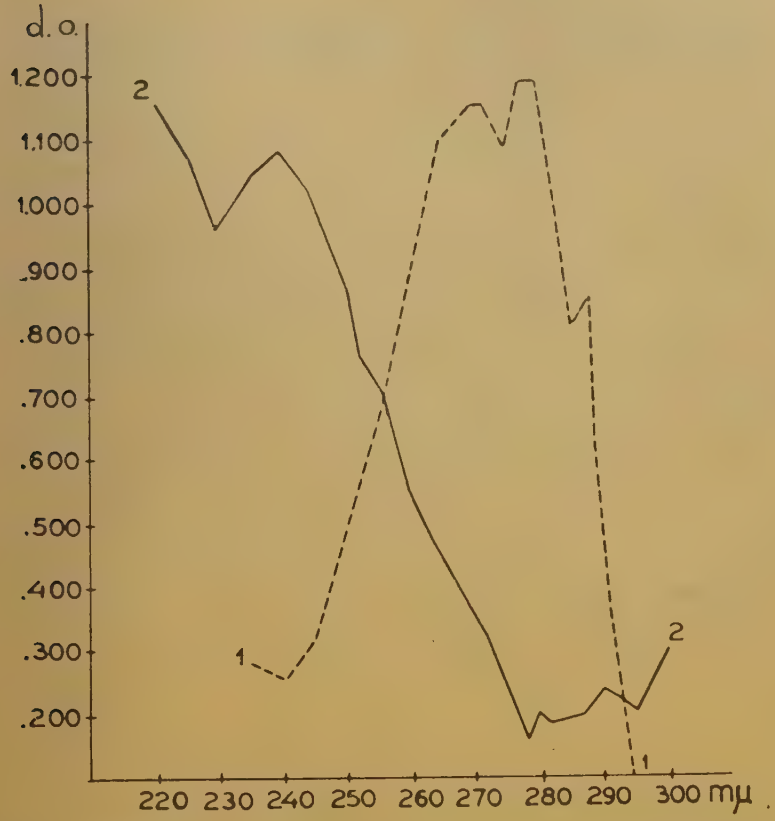


Fig. 5 — Espectros de absorção em luz U. V. do indol(1) e do aldeido indólico (2).

tir da leitura da densidade ótica num espectrofotômetro BECKMANN DU, munido de uma lâmpada de hidrogenio. As leituras, em cada caso, foram feitas entre 220 e 300 mμ, a intervalos de 2 ou de 5 mμ.

Para fim de comparação foram igualmente preparados espectrogramas do indol e do aldeido indólico (Fig. 5). A primeira dessas

substâncias era da firma E. Merck, Darmstadt, Alemanha e o aldeido indólico foi adquirido de Bios Laboratories, Inc., Nova York.

RESULTADOS

As figuras 2 a 5 mostram alguns espectrogramas típicos obtidos de acôrdo com este método.

Os diversos spots ou zonas dos cromatogramas analisados espectrograficamente estão aqui designados pelo número correspondente da figura 1.

Zona 2: A solução eluida da zona 2 fornece espectrogramas extremamente variáveis. A figura 2 mostra algumas das curvas obtidas: *a* e *b*, a partir de cromatogramas duplos, *c* e *d*, de cromatogramas simples. Reconhece-se em b o máximo de absorção da zona 4, entre 255 e 265 mμ e em *c* um dos da zona 3.

Zonas 3 e 4: A figura 3 mostra espectrogramas característicos obtidos da eluição dessas zonas. Na curva de 3 há um máximo de absorção pronunciado em 242 mμ e outros em 258 e 305 mμ. Na de 4 há um máximo em 255 mμ mas a maior absorção verifica-se para as ondas mais curtas.

Zonas 5, 6_1, 6_2 e 7: Estas zonas, que ladeiam a zona 4 nos cromatogramas, dão espectros de absorção muito diferentes, conforme se vê na figura 4. O espectrograma da zona 7 mostra uma absorção máxima entre 260 e 280 mμ que pode ser considerada típica do núcleo indólico, pois é encontrada nos espectrogramas do indol (Fig. 5) e de diversos derivados indólicos como o ácido indolacético, o escatol, a triptamina, a triptofana, etc.. No caso da zona 5, este máximo acha-se deslocado para as ondas curtas, ou seja 246 mμ. A zona 6_1, fornece uma curva quase paralela a 5. A zona 6_2 absorve a luz ultravioleta nas ondas as mais curtas.

DISCUSSÃO

Os resultados do estudo espectrográfico das diversas zonas dos cromatogramas dos produtos da decomposição do ácido indolpirúvico devem ser analisados à luz dos resultados do estudo cromatográfico desses produtos e de suas reações coloridas e microquímicas (SCHWARZ e BITANCOURT loc. cit.).

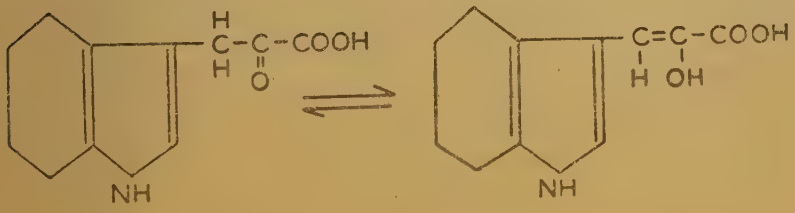
No citado trabalho, a zona 2, que fornece com a 2,4-dinitrofenilhidrazina e o hidróxido de sódio uma reação côr de vinho e microcristais ramificados, é considerada a forma cetônica do ácido indolpirúvico. Na segunda cromatografia a zona 2 se divide principalmente nas zonas 2, 3 e 4. Os seus espectrogramas são extremamente

variáveis, sem dúvida porque na eluição ela manifesta a tautomeria ceto-enólica, mostrando as variações dêste equilíbrio. As curvas da zona 2 (Fig. 2) são portanto o resultado da superposição das curvas características dessas diversas substâncias. Na curva *a* nenhuma das substâncias predomina, mas *b* deve seus caracteres principalmente à substância da zona 4 e *c* à substância da zona 3. Em *d* predomina uma substância com máximo visinho de 280 mμ.

A zona 4, — que nos cromatogramas duplos se transforma em parte na zona 2 e não parece possuir o grupo C=O, pois só reage com a dinitrofenilhidrazina depois de uma hora, sendo, por isto, considerada a forma enólica do ácido indolpirúvico (loc. cit.) — mostra em seus espectogramas um máximo de absorção em 255 mμ e, ao contrário da zona 2, apresenta reprodutibilidade desses espectrogramas.

STOWE[3] mostrou que a transformação da forma enólica na forma cetônica, do ácido indolpirúvico, caracterisa-se pelo aumento da absorção em 280 mμ e pelo aparecimento da reação colorida com a dinitrofenilhidrazina.

Na tautomeria ceto-enólica das zonas 2 e 4, que se transformam uma na outra, a passagem da forma cetônica (I) para a forma enólica (II) é o resultado do deslocamento da dupla ligação da cadeia lateral, produzindo a sua conjugação com uma dupla do anel pirrólico do núcleo indólico.



I II

Conforme observa o Prof. STAMMREICH, êsses deslocamento da dupla ligação resulta de outra distribuição dos electrons localisados no anel, a qual produz uma modificação do espectro de absorção, conforme é conhecido em muitos casos semelhantes.

Assim podemos admitir que o máximo em 270-280 mμ corresponde ao anel não perturbado, ao passo que a conjugação das duplas

(3) Stowe, B. B. Behavior of Indole Pyruvic Acid. 3 pp. datilografadas com 1 gráfico. (inédito, comunicado por K. V. Thimann).

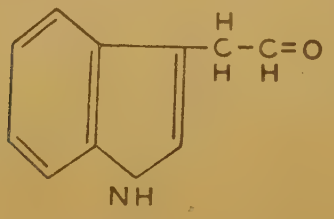
ligações causaria o deslocamento dêste máximo na direção das ondas curtas. As curvas do indol como a do aldeido indólico fornecem outro exemplo em que êsse tipo de deslocamento é observado (Fig. 5). De fato, o aldeido possue uma dupla ligação na cadeia lateral, conjugada com uma dupla ligação do núcleo indólico.

Entre os diversos espectrogramas da zona 2 (Fig. 2) *d* é o que apresenta mais acentuadamente os caracteres espectrográficos do anel indólico não perturbado e portanto deve ser o de um eluido da zona 2 que continha quantidade da forma cetônica do ácido indolpirúvico, maiores do que os outros.

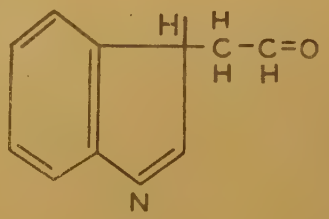
A zona 3, — neutra, estável e que não parece ser produto de decomposição e sim de condensação (loc. cit.), — revela em seus espectrogramas a perturbação do núcleo indólico a que acima nos referimos.

As zonas 5 e 6_1 mostram curvas paralelas (Fig. 4) e portanto parecem corresponder a substâncias muito semelhantes. SCHWARZ e BITANCOURT (1957) estabeleceram a sequência das diversas zonas, que resulta do aparecimento sucessivo das substâncias correspondentes nas soluções ou durante a cromatografia. Eles mostraram que a zona 6_1 aparece depois da zona 5. A zona 5 é instável e passageira, dando reações positivas com a dinitrofenilhidrazina e o "spot-test" da fucsina para os aldeidos (FEIGL 1954)). Durante o fracionamento etereo a substância da zona 5 desaparece, ao passo que a da zona 6_1 passa para a fração neutra. E' uma zona pouco marcada, que reage com a dinitrofenilhidrazina. Por estes motivos foi sugerido que tanto 5 como 6_1 seriam aldeidos, aliás muito próximos do indolaldeido que apresenta um espectro de absorpção no ultra-violeta, muito semelhante.

Considerando-se que 6_1 aparece depois de 5 e é zona muito fraca, formando uma "cauda" nos cromatogramas, pode-se pensar numa transformação lenta do indolacetaldeido (III) que seria 5, em indolenina-acetaldeido (IV), a zona 6_1[4].



III



IV

(4) Elderfield, R. (editor). Heterocyclic compounds. Vol. 3. 1952. Wiley & Sons, New York.

O espectrograma da zona 7 apresenta o máximo característico dos derivados indólicos, isto é, sem perturbação do anel indólico causado pela conjugação de duplas ligações, o que está de acôrdo com a sugestão que ela corresponderia ao ácido indolelactico (loc. cit.).

Uma extensão destes estudos à região das ondas mais compridas do U. V., talvez pudesse fornecer novos elementos para a identificação dos produtos de decomposição do ácido indolpirúvico. Tal identificação, entretanto, será provavelmente sempre dificultada pela instabilidade inerentes das substâncias eluidas dos "spots" cromatográfico, que faz com que seus espetros não são sempre reproduziveis.

SPECTROGRAPHY OF THE PRODUCTS OF THE SPONTANEOUS DECOMPOSITION OF INDOLEPYRUVIC ACID

Abstract

The ultra-violet spectra of products eluted from paper chromatograms prepared from solutions of indolepyruvic acid are represented and discussed. The substances, numbered 1 to 7, detected in the chromatograms as described in a previous paper (Schwarz and Bitancourt 1957) either show an absorption peak at 280 mμ, characteristic of the indole nucleus or a dislocation of that peak toward shorter wave-lengths. The dislocation is attributed to the conjugation of a double-bond in the side-chain with another one in the pyrrole moiety of the indole nucleus. It supports the suggestion of the cited paper that products 2, 4, 5, 6_1, and 7, are respectively: the ketonic and enolic forms of indolepyruvic acid, indoleacetaldehyde, indolenine acetaldehyde and indolelactic acid.

———o———

Vol. 24 — Artigo 7 Novembro de 1957

MÉTODO RÁPIDO DA LIBERAÇÃO DA MUCILAGEM DO CAFÉ DESPOLPADO PELA ATIVAÇÃO DE SUAS PRÓPRIAS ENZIMAS

II — DESGOMAGEM RÁPIDA DO CAFÉ DESPOLPADO EM CONTRASTE COM A FERMENTAÇÃO PROLONGADA: MUCILAGEM BRUTA LIBERADA

POR

J. Pereira Jr.

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 2 tabelas no texto

Em trabalhos anteriores (PEREIRA, JR. 1956-1957), verificámos que as enzimas presentes na polpa do café cereja, pódem ser ativadas por cations, exercendo-se então uma intensa atividade desgomante no despolpado, em temperatura ambiente, libertando-o, em uma hora, da sua mucilagem, sem necessidade da adição de qualquer enzima extranho.

Procuraremos, agóra, verificar o comportamento da mucilagem do café despolpado, tanto em face de um minimo de ativador, quanto em presença de fluoreto de sódio como inibidor (SUMNER e MYRBÄCK, 1950, pg. 332), e ainda em meio alcalinisado com hidroxido de calcio, bem como o comportamento desta mucilagem na fermentação expontanea pelos germes da agua e do ar que a contaminam após o despolpamento.

PARTE EXPERIMENTAL

As cerejas maduras de café Mundo Novo, da primeira produção do parque deste Instituto, foram despolpadas a mão, para se tentar obter o despolpado com o maximo possivel da mucilagem existente.

Este despolpado após 2 ou 3 lavagens com porções de agua corrente, foi dividido em lotes de igual peso e esgotado sobre peneira de arame. Os volumes de lavagem, com a mucilagem bruta mecanicamente liberavel, foram medidos e saturados de cloroformio, para impedir o prosseguimento de ações por microorganismos. Como meio desgomante usamos a solução de hidroxido de calcio a 0,16%, ativada por cloreto de sódio a 0,1%.

Esta concentração do ativador, inferior à que seria necessária para ativar as esteráses animais usadas em trabalho anterior (PEREIRA, JR. 1956), está contudo, na concentração ótima verificada

por (PALLMANN e cols. 1946), para a ativação de esteráses vegetais, mesmo em pH francamente acido.

Do mesmo modo que na publicação anterior (PEREIRA, JR., 1956), a fonte de hidroxido de calcio foi a cal virgem comercial, que na concentração de 1% em agua permite obter-se uma solução saturada daquele produto. Por filtração em papel de filtro ou em filtro de algodão hidrofilo, obtinha-se uma solução completamente transparente, na concentração de $Ca(OH)_2$ de $1{,}65 \times 10^{-1}$ em 100 cm^3 de agua, a 20°C (HODGMAN e LANGE, 1951-52). A uma parte desta solução era adicionado o peso de cloreto de sódio comercial, para traze-lo à concentração final de 0,1%, ao se completar o volume desejado, tendo-se em mente o equilibrio que se estabeleceria entre os sais de calcio e de sódio, na mistura.

Os dados estão distribuidos nas Tabelas I e II, em que a desgomagem é feita respectivamente em 30 e 60 minutos, seguida de re-desgomagem por 30 minutos, para se tentar seguir o ritmo da desgomagem no tempo.

A Tabela I nos mostra que a mucilagem mecanicamente liberavel por lavagem, parece conservar os seus caracteristicos originais de viscocidade por muitas horas, pois, a sua filtração em papel de filtro xarope, proveniente de um lote de 200 g de despolpado, demorou 44 horas 30 minutos, comparavel ao que demoraram o lote 1 e o lote 5, aquele, em agua corrente e este, em agua acidulada, por meia hora.

Todos os lotes foram re-desgomados por meia hora, na mistura de hidroxido de calcio a 0,16% e cloreto de sódio a 0,1%.

Os lotes 1 a 5 nos mostram o efeito de 30 minutos de ação do meio à temperatura de 22,2°C sobre o café maduro, despolpado. E' de se notar que após este tempo, nos lotes 1 e 3, respectivamente em água corrente e o meio desgomante inibido por fluoreto de sódio a 0,2 por cento, verifica-se a maior frequencia de grãos aderentes, após enxugar por 20 horas sobre papel de filtro.

O lote 4, com sulfato de aluminio a 0,2 por cento foi usado para se verificar o efeito de anion tri-valente, admitidamente mais ativo para as esteráses que os monovalentes (SUMNER e MYRBÄCK, 1950, pg. 753); infelizmente, não se dispunha de cloreto de aluminio que seria mais adequado. Como testemunha deste, o lote 5 foi acidulado tambem a pH 5. E' de se notar que o peso de mucilagem bruta, seca, recuperavel nestes 2 lótes é da mesma ordem de grandeza da obtida no lote 1, só com agua; do mesmo módo, na re-desgomagem, feita 20 horas após.

TABELA I

DESGOMAGEM RAPIDA DE CAFE' DESPOLPADO A MÃO

ATIVAÇÃO DE SUAS PROPRIAS ENZIMAS: EFEITO DE AGUA, DO SULFATO DE ALUMINIO, DO FLUORETO DE SÓDIO, DA ACIDEZ DO MEIO. COMPARAÇÃO COM A DESGOMAGEM BACTERIANA, EXPONTANEA. MUCILAGEM BRUTA FILTRADA E SECA A 100ºC

Mucilagem mecanicamente liberavel em 200 g deste despolpado; 0,938 g. em 1.000 g; 4.690 g. duração de filtração: 44 hrs. e 30 mins.

LOTE N.º	MEIO: 1 l. DESPOLPADO 200 g	Desgomagem duração	Após enxugar 20 horas ao ar	Mucilagem bruta, seca a 100ºC. liberada de 200 g. Despolpado em 30 minutos			Re-Desgomagem após 20 hrs.	Mucilagem residual, bruta, seca a 100ºC, liberada de 200 g de despolpado em 30 minutos adicionais		
		Minutos	Grãos aderentes	Filtração em horas	Em 200 g	Em 1000 g		Em 200 g	Em 1000 g	Total (A + B) Em 1000 g
						A)			B)	
1	Agua corrente pH 6	30	20 grupos de 2-3	46,30	2,480 g	12,400 g	$Ca(CH)_2$ 0,16% NaCl 0,1%	0,950 g	4,750 g	17,250 g
2	$Ca(OH)_2$ 0,16% NaCl 0,1% pH 9	30	2 grupos de 2	0,45	2,980 g	14,900 g	pH 9	0,444 g	2,220 g	17,120 g
3	FNa 0,2% $Ca(OH)_2$ 0,16% NaCl 0,1% pH 9	30	16 grupos de 2-3	1,55	0,451 g	2,255 g	30 minutos com agitação	2,069 g	10,345 g	12,570 g
4	Sulfato de aluminio 0,2% pH 5	30	1 grupo de 2	1,25	2,460 g	12,300 g	mecanica	0,944 g	4,720 g	17,020 g
5	Agua corrente acidulada com HCl a pH 5	30	1 grupo de 2	44,57	2,460 g	12,300 g	frequente	0,783 g	3,915 g	16,215 g
	FERMENTAÇÃO EXPONTANEA DE DESPOLPADO									
6	200g de despolpado lavado: amontoado por 20 horas				3,510 g	17,550 g		0,110 g	0,550 g	18,100 g
7	129,5 g de despolpado lavado: amontoado por 44 hrs.				1,158 g	5,790 g		0,565 g	2,825 g	8,615 g

O lote 2 sob a mistura hidroxido de calcio a 0,16% e ativado por cloreto de sódio a 0,1% mostrou o maximo de mucilagem liberavel em meia hora, e um minimo na re-desgomagem.

Em contraposição o lote 3, onde a mesma mistura desgomante é inibida por fluoreto de sódio, exibiu o minimo de mucilagem removida em meia hora de desgomagem ao passo que a re-desgomagem libertou o maximo.

Os lotes 6 e 7, sob fermentação expontanea, respectivamente por 20 e por 44 horas, nos mostram que a quantidade de mucilagem bruta, residual da filtração decái, com o prolongar da fermentação além de 24 horas, chegando a cerca da terça parte em 44 horas, no lote 7. Além disso o prolongamento da atividade bacteriana não dá segurança de desgomagem mais perfeita, como se verifica para o lote 7, nas colunas de re-desgomagem.

Dos dados desta tabela, referidos a 200 g de despolpado e recalculados para 1000 g, póde-se deduzir que uma parte da mucilagem do café cereja póde ser mecanicamente arrastada no ato do despolpamento; outra parte póde ser liberada do café maduro por estagio em agua corrente; mas uma outra porção da mucilagem presente no fruto, só se libera rapidamente por ativação das enzimas pectoliticas do fruto, ou então por fermentação por microorganismos durante longas horas.

Dada a possibilidade de retenção de detritos da polpa na mucilagem mecanicamente liberavel e em vista do prolongado da filtração desta e dos lotes 1 e 5, levantou-se a suspeita de que a mucilagem bruta, seca, por filtração, além de impura, já poderia estar sendo, em parte, hidrolisada pelas enzimas nela ainda presentes. Fizemos, pois, mais uma repetição, cujos dados se encontram na Tabela II.

Aqui se comparam em 3 lotes de despolpado a quantidade de mucilagem bruta mecanicamente liberavel, após duas lavagens de agua corrente: o volume de liquido combinado dos 3 lotes, após medido, fornecia por pipetagem uma aliquota de 9 cm^3, para tubos de centrifugação tarados, onde se precipitava imediatamente, por adição de acetona, até atingir 60% daquele volume.

Cada lote de 70 g de despolpado lavado, era então coberto por 100 cm^3 de agua, ou de solução a 0,16% de hidroxido de calcio, ou da mistura de hidroxido de calcio a 0,16% e de cloreto de sódio a 0,1%, em cilindro graduado de vidro, por uma hora. Lógo em seguida se procedia à re-desgomagem de cada lóte por meia hora na

TABELA II

INFLUENCIA DO ATIVADOR NA RAPIDEZ DA DESGOMAGEM DO CAFE' MUNDO NOVO; CEREJAS MADURAS, DESPOLPAMENTO MANUAL. MUCILAGEM BRUTA PRECIPITAVEL POR ACETONA A 60%

Lote N.º	Despolpado fresco lavado	Mucilagem mecanicamente liberavel combinada dos 3 lotes. Seca a 100ºC. por 20 horas	DESGOMAGEM				RE-DESGOMAGEM		
			Volume de liquido Temp. 23ºC.	Duração	Mucilagem precipitada por acetona a 60%, seca por 20 horas a 100ºC.		De cada lote em 80 cm³ da mistura $Ca(OH)_2$ 0,16%, mais NaCl 0,1%, por 1/2 hora Mucilagem precipitavel por acetona seca a 100ºC.		
					Em 70 g.	B) Em 1000 g.	Em 70 g.	C) Em 1000 g.	Total (A+B+C) Em 1000 g.
1	70	Em 210 g: 2,037 g.	Agua corrente 100 cm³	1 hr.	0,639 g.	9,128 g.	0,097 g.	1,388 g.	20,216 g.
2	70	A) Em 1000 g: 9,700 g.	$Ca(OH)_2$ 0,16% 100 cm³	1 hr.	0,611 g.	8,728 g.	0,014 g.	0,200 g.	18,628 g.
3	70		$Ca(OH)_2$ 0,16% NaCl 0,1% 100 cm³	1 hr.	0,222 g.	3,171 g.	0,042 g.	0,600 g.	13,471 g.

mistura de hidroxido de calcio e cloreto de sódio, acima referida, com agitação ocasional.

Após a desgomagem e re-desgomagem, cada lóte era lavado por 2 vezes, sendo o volume de liquido de cada um medido e pipetadas aliquotas de 9 cm^3 em tubo de centrifugação tarados e a mucilagem precipitada por acetona até à concentração final de 60%. Após centrifugação a 3.000 rotações por minuto, os sobrenadantes escorridos, os tubos ficavam alguns minutos invertidos sobre papel de filtro, antes de irem à estufa a 100°C, por 20 horas. O peso de mucilagem bruta, seca, de cada aliquota, era referido a 70 g de café despolpado e re-calculado para a base de 1000 g de despolpado, tanto na desgomagem, como na re-desgomagem de meia hora, feita lógo em seguida àquela.

Da tabela II é evidente que o peso de mucilagem mecanicamente liberavel por 1000 g (A) é, aqui, de 9,700 g por 1000 g de despolpado, isto é, pouco mais do dobro do obtido na Tabela I, por filtração lenta, de muitas horas. Isto sugere ali a destruição da molécula de mucilagem tanto pelas suas enzimas, como talvez tambem pela ação de microorganismo, por volatilisação do cloroformio, observado nos lótes 6 e 7 da Tabela I.

Esta destruição enzimática da molecula da mucilagem do café, em apenas 1 hora é observavel, sempre por 1000 g de despolpado, pelo menor peso desta, 8,728 g precipitavel pela acetona, quando no lote 2 o meio é alcalinisado pelo hidroxido de sódio a 0,16%; muito menor ainda, 3,171 g quando no lote 3, ao lado da alcalinisação, é adicionado o cloreto de sódio como ativador; em comparação com o lote 1 9,128 g onde o café ficou apenas banhado no mesmo volume de agua corrente, e se consegue precipitar o maximo de mucilagem.

Na re-desgomagem, feita logo em seguida, a quantidade de mucilagem bruta, ainda precipitavel por acetona, foi da ordem de 1,388 g para o lote 1, enquanto os lotes 2 e 3 acusavam 0,200 g e 0,600 g de mucilagem seca.

Esta mucilagem bruta de café deverá conter uma quantidade variavel de goma precipitavel por acetona, como ocorre em todos os frutos onde se encontra pectina ou mucilagem.

Uma evidencia muito clara da solubilisação da mucilagem, por degradação enzimática de sua molécula, temos ao se comparar só os valores de mucilagem bruta, seca, por 1000 g de despolpado, na desgomagem (B) e na re-desgomagem, somados para cada lóte. lóte 1 (B + C) = 10,516 g; lote 2 (B + C) = 8,928 g; lote 3 (B + C) = 3,771 g. Tomando-se esta soma da mucilagem seca, bruta, de B + C para cada lóte, sendo o lote 1 igual a 100%, o lóte B, só sob a ação

do meio alcalino precipita por acetona 84,9%, enquanto o lóte 3 sob a ação combinada do meio alcalino plus activador, apresenta só 35,8 por cento de mucilagem precipitavel.

Como documentação das alterações de viscocidade que se produzem na mucilagem do café despolpado, sob a ação de diversos alcalis e de ativadores, discriminamos abaixo os protocolos de 8 lótes de 93 g de café despolpado de cerejas de café Bourbon, maduras, colhidas cerca de 30 horas antes na Fazenda Mato Dentro, deste Instituto em Campinas. Para se ter a mucilagem tão concentrada quanto possivel, a massa de 93 g despolpado era recoberta com apenas 100 cm^3 de meio desgomante. Após 1 hora de permanencia no meio a 23°C, o despolpado era separado por peneira da massa mucilaginosa, então posta a filtrar em papel de filtro canelado. Designamos por filtração lenta, o equilíbrio que se estabelece, em que após 1 hora, o nivel da massa filtrante, parece não se alterar. Os grãos, lavados em agua corrente, eram secados a 100°C, em estufa, após verificação ao tacto, do grão de asperesa do pergaminho:

a)	$Ca(OH)_2$ 0,16 por cento.	Em 15 minutos forma-se massa gelatinosa espessa, Filtra lentamente. Pergaminho geralmente aspero; alguns ainda lisos.
b)	$Ca(OH)_2$ 0,16 NaCl 0,4 } por cento	Em 10 minutos, gélea parda, firme. Filtra em menos de 30 minutos. Pergaminho aspero.
c)	$Ca(OH)_2$ 0,08 NaCl 0,4 } por cento	Dá geléa espessa aos 5 minutos. Filtra lentamente. Pergaminho aspero.
d)	$Ca(OH)_2$ 0,16 $CaCl_2$ 0,4 } por cento	Em poucos minutos forma-se geléa espessa, parda: Filtra em menos de 30 minutos. Pergaminho aspero.
e)	KOH 2,0 CaCl 0,4 } por cento	Desenvolve-se viscocidade espessa, fluida. Filtra lentamente sem aderir ao papel. Pergaminho aspero.
f)	KOH 0,5 NaCl 0,4 } por cento	Mucilagem espessa, de cor rosada. Cessa a filtração aos 15 minutos. Pergaminho aspero.
g)	NaCl 0,4 por cento	Produz geléa espessa, de cor parda. Cessa a filtração nos primeiros minutos. Pergaminho geralmente aspero.

h)		Despolpado coberto com agua e mergulhado em agua fervente por 30 minutos. Esfriado, lavado e desgomado por:
$Ca(OH)_2$ 0,16 NaCl 0,4	por cento	Alguma mucilagem liberada, não filtrada. Pergaminho com fina camada lisa, brilhante, aderente.

DISCUSSÃO

O despolpamento manual das cerejas de café veio revelar um afrouxamento progressivo da mucilagem da polpa, a partir do pergaminho, onde parece estar fortemente aderente. As camadas mais externas, de mucilagem muito frouxa, podem ser acarretadas mecanicamente pela agua de despolpamento; outra parte da mucilagem do café maduro póde ser liberada por um estagio de meia ou uma hora em agua. Contudo, a mucilagem mais imediata ao pergaminho parece tão solidamente estruturada a este, que só a alcalinidade do meio ou só o ativador são incapazes de rapidamente libera-la, como se observa nas Tabelas I e II.

Este fenomeno de afrouxamento progressivo da mucilagem do café parece acompanhar o colorido de amadurecimento do fruto. Aparentemente o desenvolvimento das enzimas pectoliticas e da mucilagem, a partir dos constituintes celulares, se processa gradativamente, enquanto o fruto amadurece.

Assim é que LILIENFELD-TOAL (1932) já tinha verificado que em café cereja super-maduro, (passa), despolpado e agitado vigorosamente com agua, a mucilagem se dissolve com rapidez; mesmo na cereja, estes fermentos já estariam ativos. Ao contrario, em café despolpado ainda imaturo nem a permanecia de 8 dias em agua saturada de cloroformio, para evitar as fermentações por microorganismos, foi capaz de liberar a mucilagem.

Deste módo, a maturação do café corresponderia à de outros frutos, mas com enzimas que dissolvem a polpa, ao amadurecer.

Estas enzimas, como as esteráses de outros frutos (PALLMANN e cols.), são ativadas por concentrações tão baixas de ativador que 0,1 por cento de cloreto de sodio ou de calcio, podem acelerar a desgomagem do café maduro despolpado, quando a operação é feita acima de 15°C. De fáto, ao se desgomar diferentes lotes de 18 a 22 quilos de despolpado, em dias sucessivos, com identica mistura de alcali e de ativador, acima de 15°C, foi possivel dar por terminada a operação até em 20 minutos. Em contraposição, 3 partidas desgo-

madas entre 12,3° e 13,5°C, não puderam ser terminadas satisfatoriamente mesmo com 2 horas de permanencia no meio desgomante.

As Tabelas I e II e mais precisamente esta, dão bem a ideia do afrouxamento da mucilagem da polpa que acompanha o despolpado, pois que cerca de metade desta mucilagem é libertavel por agitação em agua. Mas o total de mucilagem só pode ser afastado do pergaminho, ou por longas horas de fermentação por microorganismos do ambiente, ou em até menos de uma hora, conforme a temperatura, pela ativação das enzimas contidas na polpa.

Em presença de sais de calcio, a ativação das esteráses que tomam parte na desgomagem, além de liberar esta mucilagem firmemente aderida ao pergaminho, produz ainda, o encurtamento da sua cadeia molecular, de modo que a fração desta, precipitavel por acetona, vai diminuindo conforme a enzima atúa mais intensamente (Tabela II) ou como se observa no resumo dos protocólos, pela velocidade de filtração dos lotes *b* e *d*. Além disso em comparação com os sáis divalentes, os monovalentes do sódio ou de potassio, mesmo ativados, ou o só ativador, não conseguem degradar a molecula de mucilagem tão rapida e profundamente, pois a sua viscosidade ainda elevada, torna a filtração lenta, como se observa nos lotes *a, c, f, g, h.*

Os dados apresentados neste trabalho, mostram que a desgomagem de diferentes variedades de café maduro despolpado, pelas suas enzimas, póde ser feita até o esgotamento da mucilagem, em meio alcalino, em presença de cloreto de sódio ou de calcio, pela desintegração parcial das moléculas desta mucilagem.

Apenas devemos ressaltar o papel da velocidade desta desgomagem na obtenção de café superiormente apresentaveis comercialmente, lembrando com DAFERT e RIVINIUS (1894-95) o impecilho de secagem, de café com mucilagem, altamente higroscópica; além disso, a muito curta permanencia do despolpado em meio desgomante é uma garantia contra a perda de peso do café, como já se sabia em 1931 por publicação anonima do Instituto do Café, onde se vê que uma fermentação ultrapassando 10, 12 horas, já acarretaria perda de peso de 8 por cento.

E' pertinente lembrar que, este processo de desgomagem rapida, alem de evitar a "quebra" de peso da safra, ocorrendo nas fermentações de muitas horas, ainda traz a vantagem evidente de economisar a mão de obra e instalações. Com efeito, em um dia de trabalho, pódem ser desgomados lavados e imediatamente postos a

secar, no minimo 8 lotes de despolpado, em quanto se teria apenas 1 lote quando em fermentação, em temperatura ambiente.

A preocupação existente nas classes mais cultas do Brasil, desde inicios do Imperio, para melhorar a apresentação comercial do café, não parece ter se aprofundado na mentalidade de nossos cafeicultores, nos longos lustros decorridos. De fáto, TAUNAY (1939), ao tratar do periodo historico de 1822 e 1872, cita uma pleiade dos chamados teóricos da lavoura, esforçando-se por que os lavradores diligenciassem a não prejudicar o produto das suas lavouras: cita, entre outros, FREYCINET, ao tratar do café no Rio de Janeiro, observa que os cafeeiros "produzindo frutos de boa qualidade, pouco apreciados na Europa, contudo, devido aos vicios do seu beneficiamento. Perdia o café do Brasil a côr natural por falta de cuidados"... O quadro se agravava na secagem do café "nem sempre efetuada com perfeição, em consequencia das localidades às vezes abrigadas do sól, ou expostas a um clima humido e inconstante".

Mais tarde CALDEIRA (1843) além de desenhar despolpador, maquina de beneficio e insistir na secagem a meia sombra, segundo observou em viagem às Antilhas e America Central, preconisava o emprego de cinza ou cal viva, para lixiviar a mucilagem do despolpado com mais rapidez que por fermentação. Estes ingredientes foram sendo pouco a pouco, por toda parte, abandonados pois em muitos casos, segundo a proveniencia da cal ou da cinza comunicava-se máu gosto ao café. DAFERT e RIVINIUS (1894-95), pg. 153 reconhecendo-lhes, embora o papel acelerador de desgomagem do café, reconheciam ser "entretanto, pouco favoravel a sua introdução na pratica".

O processo que estamos estudando, pelo emprego adequado de quantidade minimas de alcali e de ativador, onde o despolpado permanece um minimo de tempo, acha-se livre destas objeções, como veremos em proxima publicação, acerca do seu efeito sobre a qualidade da bebida obtida.

A METHOD FOR QUICK FREEING OF PULPED COFFEE BEANS FROM THEIR MUCILAGE THROUGH ACTIVATION OF ITS OWN ENZYMES. II — QUICK FREEING OF PULPED COFFEE BEANS' MUCILAGE AS CONTRASTED WITH LENGTHY FERMENTATION: THE CRUDE MUCILAGE

Abstract

The ripe coffee beans of pulped coffee, possess enough enzymes to free them from all the adhering mucilage, in 1 hour, or even less, in alcaline medium when activated by 0,1 per cent mono-valent me-

tallic chloride ions, or even better, by di-valent ones, in temperatures above 15°C.

The enzymic freeing of the mucilage is apparently conditioned to its molecular breakdown, chiefly in the presence of di-valent metallic ions.

It is stressed the significance of this method of quick freeing of the mucilage of ripe, pulped, coffee beans, with its crude yield of mucilage, and its implications to the economy of pulping and drying operations at the plantation.

BIBLIOGRAFIA

1) Anonimo — 1931 — Conselhos uteis aos fazendeiros. *Rev. Instituto do Café.* Est. de S. Paulo, 14 (61): 950.

2) Caldeira, Antonio da Silveira — 1843 — Memoria sobre hum novo methodo de preparar o café, precedido de algumas noticias historicas do cafezeiro, seu fructo e dos diversos modos de o preparar seguidos até o presente. Tipografia Universal de Laemmert. — Rio de Janeiro.

3) Dafert, F. W. e L. Rivinius — 1894-95 — A secagem do café I. Relatorio Anual do Instituto Agronomico do Estado de S. Paulo, em Campinas, *VII* e *VIII;* 103-174.

4) Hodgman, C. D. e N. A. Lange — 1951-52 — Handbook of Chemistry and Physics. Chemical Rubber Co. Cleveland, Ohio.

5) von Lilienfeld-Toal, Otto H. — 1932 — Über Kaffeefermentation. *Zentralblatt f. Bakteriol. Parasitenkunde und Infections krankheiten,* 2 (85): 250-269.

6) Pallmann, H. J. Matu:, H. Deul e F. Weber — 1946 — Über die Artivität der Pektinase. *Rec. Trav. Chim.* Pays-Bas, 65 (9): 633-640.

7) Pereira, Jr., J. — 1956 — Método rapido de liberação da mucilagem do café despolpado pela ativação de suas proprias enzimas. I — Esteráses pancreáticas e ativadores cationicos na desgomagem do café despolpado. *Arquivos do Instituto Biológico,* 23: 79-86.

8) Pereira, Jr., J. — 1957 — Despolpamento e produção de cafés de fino paladar. *O Sólo* (em publicação).

9) Pereira, Jr., J. — 1957 — Método rápido de liberação da mucilagem do café despolpado pela ativação de suas próprias enzimas e o problema da bebida fina. *Anhembi,* 22 (82): 70-88.

10) Sumner, J. B. e K. Myrbäck — 1950 —The Enzymes. Chemistry and Mechanism of Action *I* (1). Acad. Press. Inc. New York.

11) Taunay, Affonso de E. — 1939 — Historia do Café no Brasil. *V* (3). No Brasil Imperial (1822-1872). Ed. Dep. Nac. do Café. Rio de Janeiro.

Vol. 24 — Artigo 8 Novembro de 1957

AS PULVERIZAÇÕES CONCENTRADAS NO COMBATE AO "BICHO-MINEIRO" DAS FÔLHAS DO CAFEEIRO, *PERILEUCOPTERA COFFEELLA* (GUÉRIN-MÉNEVILLE) *(LEPIDOPTERA-BUCCOLATRICIDAE)*

POR

G. Calcagnolo e L. Leiderman

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 7 tabelas no texto

Não se sabe com segurança nem como e nem em que data o "bicho-mineiro" foi introduzido no Brasil. O certo é que por volta de 1860 manifestou-se como praga alarmante em cafezais dos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais e cerca da mesma época surgiu nas lavouras paulistas. De então para cá, disseminou-se pelas culturas de tôdas as zonas.

Conquanto não seja conhecida a extensão dos prejuizos que proporcione ao cafeeiro, o fato é que o ataque verificado, de normalmente intenso a muito forte em determinados anos, motivou interêsse em combatê-lo, prática que se generalizou entre os cafeícultores que passaram a empregar as formulações dos inseticidas preconizados.

No Instituto Biológico de São Paulo, PINTO DA FONSECA (5 e 6), SEIXAS (9 e 10), SAUER (8), VASCONCELLOS et al. (12) e AMARAL (3) estudaram a ação dêsses produtos, determinando entre os diversos inseticidas, em várias dosagens e sistemas de aplicação, os que melhor atendiam ao combate.

O presente trabalho, realizado pela Seção de Entomologia Agrícola, objetivou dar prosseguimento às investigações, visando o estudo comparativo de quatro inseticidas de alta eficiencia na debelação do inseto, empregados sob a forma de pulverizações concentradas e de tal modo que a praga pudesse ser combatida na época de maior incidência, procurando reduzir mais os dispendios tidos com os tratamentos químicos. Tendo sido evidenciado por trabalhos anteriores que as pulverizações são mais eficazes que os polvilhamentos, especialmente devido à capacidade de certos produtos matarem também as larvas dentro das galerias, os autores, através do emprêgo do baixo volume, pretendem que, mantendo a mesma eficácia, o trabalho torne-se mais facilitado, dada a redução do emprêgo da agua que o método acarreta.

Consignamos nossos agradecimentos a H. F. G. Sauer pelas sugestões que facilitaram a condução do trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentados foram instalados em Jaú, na Fazenda "São José" *, num cafezal com cerca de quatro anos, das variedades "Bourbon vermelho" e "Bourbon amarelo".

Em virtude de observações anteriores terem evidenciado que as infestações do "bicho-mineiro" agravam-se a partir do início da estiagem, os tratamentos iniciaram-se em 13 de Maio, prolongando-se até 4 de Outubro de 1955, ocasião em que as primeiras chuvas concorreram para a diminuição do ataque.

Com o propósito de estudar os melhores intervalos de aplicação dos inseticidas, num dos experimentos os tratamentos foram realizados de três em três semanas e no outro, de cinco em cinco semanas. Nêsses campos foram confrontados quatro inseticidas nas formas de concentrados emulsionáveis e pós molháveis, visando avaliar uma possível variação na ação dos produtos quando em formulações diferentes.

O delineamento estatístico empregado em ambos os ensaios foi o de blocos ao acaso, repetidos quatro vezes, contendo cada bloco nove tratamentos inclusive a testemunha. Cada parcela constituiu-se de seis cafeeiros separados das parcelas visinhas por duas ruas de plantas em todos os sentidos, totalizando 832 cafeeiros por experimento.

Os diversos tratamentos, aplicados em pulverizações a baixo volume, tiveram as seguintes concentrações porcentuais em princípio ativo: — concentrados emulsionáveis: BHC ** a 0,25, Dieldrin á 0,40, Parathion á 0,125 e Toxafeno *** á 2,00; pós molháveis: BHC á 0,10, Dieldrin á 0,16, Parathion á 0,05 e Toxafeno á 0,80.

Na aplicação dos inseticidas foram utilizados pulverizadores costais "Excelsior" equipados com bico "Teejet" X2 (concentrados emulsionáveis) e D2 (pós molháveis), gastando-se em média 160 cc. por cafeeiro para as pulverizações dos concentrados emulsionáveis e 400 cc. para as dos pós molháveis.

A avaliação da intensidade de ataque do "bicho-mineiro" se fez a partir de quatro galhos por planta num total de vinte e quatro galhos por parcela, préviamente estiquetados e dispostos segundo os quadrantes nos quais se eliminaram as fôlhas minadas antes da primeira aplicação dos inseticidas.

O número de pulverizações foi de nove no campo de três semanas e de cinco, no de cinco semanas. As contagens foram sempre

(*) Expressamos nossos sinceros agradecimentos ao Sr. Otavio Pacheco de Almeida Prado, proprietário da Faz. S. José, pela ajuda prestada durante a realização do presente trabalho.
(**) Gentilmente fornecido pela Cobin S/A Comércio e Indústria.
(***) Agradecimentos são devidos á Hercules Powder Company pelos auxílios proporcionados.

realizadas vinte e quatro horas antes dos tratamentos, nas quais se computavam os totais de fôlhas existentes nos galhos etiquetados, como também os totais de fôlhas minadas e de minas.

Embora as observações tivessem se prolongado até o início de Novembro, a análise estatística dos ensáios, realizada em função das porcentagens de fôlhas minadas e totais de minas, considerou apenas os dados obtidos nas contagens de 1.º de Agosto, no caso do campo que recebeu pulverizações a intervalos de três semanas, e os dados de 22 de Agosto, para o experimento tratado a intervalos de cinco semanas. Tal procedimento se prende ao fato de ter a infestação do inseto, nessas datas, atingindo o máximo em ambos os ensáios. Assim, a análise se refere às infestações de *Perileucoptera coffeella* existentes após quatro aplicações no caso das pulverizações de três semanas e três aplicações para os tratamentos de cinco semanas.

O estudo dos resultados se processou pela transformação em porcentagens dos dados obtidos nos campos, as quais, por sua vez, foram transformadas em ângulos, segundo a fórmula de BLISS (4), ângulo = arco seno $\sqrt{\text{porcentagem de ataque}}$, a fim de possibilitar melhor exame estatístico, que foi feito pelo método da análise da variância. As porcentagens de redução do ataque do inseto, nos diversos tratamentos, sempre calculadas em relação as testemunhas, foram obtidas pela fórmula de ABBOT (1).

Com a finalidade de observar também o nível geral de infestação da cultura, a par dos trabalhos realizados, procedeu-se a uma tomada de amostras nos dois campos, considerando desta vez não sòmente os galhos etiquetados, como também todos os demais das plantas. Para tanto, foram retiradas ao acaso 300 fôlhas por parcela, num total de 1.200 fôlhas por tratamento, à 22 de Agosto, mês que coincidiu com a infestação máxima dos ensáios.

RESULTADOS

No decorrer da experiência, os talhões apresentaram infestação satisfatória, possibilitando a obtenção de informações de intêresse com relação a ação dos inseticidas aplicados em pulverizações à baixo volume.

Uma vez etiquetados os galhos e eliminadas tôdas as fôlhas minadas, anotados os números de fôlhas minadas e de minas encontradas, verificou-se que a infestação inicial em têrmos de fôlhas minadas, era, em média, de 26,6% e 30,0%, respectivamente para os talhões onde se instalaram os campos de três e de cinco semanas.

Com relação ao experimento pulverizado de três em três semanas, a tabela 1 mostra a variação do ataque do "bicho-mineiro"

TABELA 1

Porcentagens de fôlhas minadas no decorrer do ensaio de combate à *Perileucoptera coffeella* mediante pulverizações a baixo volume a intervalos de 3 semanas. Jaú, Maio-Outubro 1955

Inseticidas	Porcentagem de princípio ativo	Formulação	12 Maio			30 Maio			20 Junho			11 Julho		
			Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque
Dieldrin	0,40	CE(*)	1196	340	28,4	934	62	6,6	916	57	6,2	851	43	5,0
Dieldrin	0,16	PM(**)	1213	296	24,4	930	84	9,0	860	179	20,8	749	176	23,5
Toxafeno	2,00	CE	1106	255	23,1	897	78	8,7	846	97	11,5	757	86	11,4
Toxafeno	0,80	PM	1215	309	25,4	972	113	11,6	890	134	15,1	762	91	11,9
BHC	0,25	CE	1185	319	26,9	910	87	9,6	967	106	11,0	791	99	12,5
BHC	0,10	PM	1311	341	26,0	985	59	6,0	886	93	10,5	783	83	10,6
Parathion	0,125	CE	1251	308	24,6	959	26	2,7	900	55	6,1	791	48	6,1
Parathion	0,05	PM	1181	336	28,4	907	33	3,6	845	56	6,6	758	54	7,1
Testemunha			1167	380	32,6	829	151	18,2	752	249	33,1	703	246	35,0

Inseticidas	Porcentagem de princípio ativo	Formulação	1 Agosto			23 Agosto			12 Setembro			3 Outubro			24 Outubro		
			Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque
Dieldrin	0,40	CE(*)	770	52	6,7	669	32	4,8	676	31	4,6	843	10	1,2	762	7	0,9
Dieldrin	0,16	PM(**)	680	242	35,6	617	217	35,2	604	220	36,4	715	231	32,3	692	174	25,1
Toxafeno	2,00	CE	641	50	7,8	593	33	5,6	613	24	3,9	698	13	1,9	691	28	4,0
Toxafeno	0,80	PM	710	81	11,4	629	65	10,3	642	68	10,6	726	37	5,1	690	38	5,5
BHC	0,25	CE	713	67	9,4	581	45	7,7	593	42	7,1	684	39	5,7	692	35	5,1
BHC	0,10	PM	718	74	10,3	579	53	9,1	583	55	9,4	711	114	16,0	652	110	16,9
Parathion	0,125	CE	714	89	12,5	640	75	11,7	614	127	20,7	693	141	20,3	657	126	19,2
Parathion	0,05	PM	675	83	12,4	562	85	15,1	564	111	19,7	710	143	20,1	651	112	17,2
Testemunha			595	301	50,6	562	235	41,8	563	234	41,6	761	202	26,5	646	153	23,7

(*) = Concentrado Emulsionável (**) = Pó Molhável

TABELA 2

Porcentagens de fôlhas minadas no decorrer do ensaio de combate a *Perileucoptera coffeella* mediante pulverizações a baixo volume a intervalos de 5 semanas. Jaú, Maio-Novembro, 1955

Inseticidas	Porcentagem de principio ativo	Formulação	12 Maio			13 Junho			18 Julho		
			Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	% de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	% de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	% de ataque
Dieldrin	0,40	CE(*)	1226	327	26,7	877	90	10,3	739	83	11,2
Dieldrin	0,16	PM(**)	1239	365	29,5	855	203	23,7	697	218	31,3
Toxafeno	2,00	CE	1118	312	27,9	798	128	16,0	710	103	14,5
Toxafeno	0,80	PM	1280	347	27,1	916	150	16,4	782	141	18,0
BHC	0,25	CE	1192	372	31,2	835	88	10,5	695	90	12,9
BHC	0,10	PM	1167	397	34,0	771	51	6,6	688	85	12,3
Parathion	0,125	CE	1214	373	30,7	812	108	13,3	672	118	17,6
Parathion	0,05	PM	1279	322	25,2	951	95	10,0	792	148	18,7
Testemunha			1261	480	38,1	755	179	23,7	612	184	30,1

Inseticidas	Porcentagem de principio ativo	Formulação	22 Agosto			26 Setembro			1 Novembro		
			Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	% de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	% de ataque	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	% de ataque
Dieldrin	0,40	CE(*)	565	44	7,8	702	16	2,3	760	5	0,7
Dieldrin	0,16	PM(**)	549	259	47,2	705	204	28,9	703	272	38,7
Toxafeno	2,00	CE	593	73	12,3	769	52	6,7	757	85	11,2
Toxafeno	0,80	PM	624	123	19,7	629	57	9,1	738	113	15,3
BHC	0,25	CE	576	91	15,8	675	56	8,3	732	125	17,1
BHC	0,10	PM	559	138	24,7	725	138	19,0	734	198	27,0
Parathion	0,125	CE	612	148	24,2	666	154	23,1	741	216	29,1
Parathion	0,05	PM	647	146	22,6	650	143	22,0	711	224	31,5
Testemunha			532	215	40,5	638	200	31,3	665	217	32,6

(*) = Concentrado Emulsionável (**) = Pó Molhável

durante todo o transcorrer do ensaio. Assim, as parcelas testemunhas apresentavam a 30 de Maio, três semanas após a eliminação de tôdas as fôlhas minadas, 18,2% de fôlhas atacadas, progredindo essa infestação até 50,6% a 1.º de Agosto, entrando a seguir em declínio. Por êsse motivo foram os dados de 1.º de Agosto escolhidos para análise estatística, com a finalidade de apurar-se os efeitos dos diversos inseticidas quando aplicados a intervalo de três semanas.

O campo que recebeu aplicações espaçadas de cinco semanas, deu 23, 7% de fôlhas minadas a 13 de Junho, cinco semanas após o início dos trabalhos, conforme se pode vêr na tabela 2. O ataque foi aumentando, atingindo 40,5%, a 22 de Agosto, decrescendo nas observações subseqüentes, razão pela qual foram também os dados obtidos nessa data considerados para análise.

Ao examinar-se as tabelas 1 e 2 convem lembrar que os dados de 12 de Maio, referem-se ao estado inicial de ambos os experimentos, principiados nessa data e pulverizados no dia seguinte, e que, os dados das datas seguintes, dizem respeito a situação dos campos, vinte e quatro horas antes de novo tratamento.

As anotações relativas ao número de minas estão condensados nas tabelas 3 e 4. Pode-se observar que êsse número sofreu constante aumento nas testemunhas e tratamentos menos eficientes, durante o decorrer dos ensáios. Levando em conta o total de fôlhas examinadas e de minas (tabelas 1 a 4) verifica-se que as maiores infestações do "bicho-mineiro", em função do número de minas, também ocorreram em Agosto, em ambos os campos experimentais.

TABELA 3

Totais de minas de *Perileucoptera coffeella* no decorrer do ensaio de pulverizações a baixo volume a intervalos de 3 semanas. Jaú, Maio-Outubro 1955

Inseticidas	Porcentagem de principio	Formulação	12 Maio	30 Maio	20 Junho	11 Julho	1 Agosto	23 Agosto	12 Setembro	3 Outubro	24 Outubro
Dieldrin ...	0,40	C.E.(*)	488	78	79	67	58	38	37	10	8
Dieldrin ...	0,16	P.M.(**)	434	90	237	283	391	395	464	663	448
Toxafeno ..	2,00	C.E.	347	85	115	105	56	37	28	13	35
Toxafeno ..	0,80	P.M.	431	182	205	129	92	80	78	48	54
BHC	0,25	C.E.	464	114	149	143	91	60	54	70	51
BHC	0,10	P.M.	483	68	133	125	95	68	204	276	173
Parathion .	0,125	C.E.	441	37	87	79	115	103	180	363	202
Parathion .	0,05	P.M.	479	40	79	71	125	109	197	351	220
Testemunha			529	211	379	385	607	523	701	664	327

(*) Concentrado Emulsionável
(**) Pó Molhável

TABELA 4

Totais de minas de *Perileucoptera coffeella* no decorrer do ensaio de pulverizações a baixo volume a intervalos de 5 semanas. Jaú, Maio-Novembro 1955

Inseticidas	Porcentagem de principio ativo	Formulação	12 Maio	18 Junho	18 Julho	22 Agosto	26 Setembro	1 Novembro
Dieldrin	0,40	C.E.(*)	499	105	99	56	18	7
Dieldrin	0,16	P.M.(**)	498	292	331	550	565	806
Toxafeno	2,00	C.E.	424	158	133	99	79	150
Toxafeno	0,80	P.M.	548	165	166	180	81	205
BHC	0,25	C.E.	536	107	104	131	84	253
BHC	0,10	P.M.	560	62	123	230	254	496
Parathion	0,125	C.E.	525	134	150	236	294	543
Parathion	0,05	P.M.	503	110	175	198	264	636
Testemunha			685	247	280	438	487	570

(*) = Concentrado Emulsionável
(**) = Pó Molhável

Os resultados referentes à eficiência dos inseticidas no combate à *Perileucoptera coffeella,* com as respectivas análises estatísticas para as infestações máximas, estão reunidos nas tabelas 5 e 6.

Na tabela 5, que apresenta as porcentagens de fôlhas minadas, observa-se, com relação aos tratamentos feitos a intervalos de três semanas, que apenas os concentrados emulsionáveis de Dieldrin, Toxafeno e BHC atingiram a uma porcentagem de redução superior a 80, enquanto os demais, com exceção do pó molhável de Dieldrin, mostraram uma porcentagem de redução superior a 70.

A análise estatística dêsse campo revela que todos os inseticidas diferiram de modo altamente significativo da testemunha, ressalvando-se o pó molhável de Dieldrin que apenas foi significativo. Com exceção dêsse tratamento que se mostrou inferior de modo altamente significativo em relação aos outros, os demais tratamentos não diferiram estatísticamente entre si. Salvo os tratamentos com Parathion, os demais, Dieldrin, Toxafeno e BHC, mostraram relativa superioridade dos concentrados emulsionáveis sôbre os pós molháveis, conquanto estatísticamente sòmente o Dieldrin apresentasse diferença altamente significativa.

A apreciação dos dados dêste mesmo ensaio (pulverizações espaçadas de três semanas), agora em função de minas (tabela 6), indica haver satisfatória concordância com os resultados obtidos para fôlhas minadas. Assim, os concentrados emulsionáveis de Dieldrin, Toxafeno e BHC tambem apresentaram porcentagens de redu-

TABELA 5

Resultados em fôlhas minadas por *Perileucoptera coffeella* em ensaios de pulverizações a baixo volume a intervalos de 3 semanas (4 aplicações) e 5 semanas (3 aplicações). Jaú, Maio-Agosto 1955

Inseticidas	Porcentagem de principio ativo	Formulação	3 semanas					5 semanas				
			Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque	Média angular	Porcentagem de redução (***)	Total de fôlhas	Fôlhas atacadas	Porcentagem de ataque	Média angular	Porcentagem de redução (***)
Dieldrin	0,40	C.E. (*)	770	52	6,7	14,6	86,8	565	44	7,8	15,9	80,8
Dieldrin	0,16	P.M. (**)	680	242	35,6	36,3	29,8	549	259	47,2	43,4	0,0
Toxafeno	2,00	C.E.	641	50	7,8	15,8	84,5	593	73	12,3	20,5	69,6
Toxafeno	0,80	P.M.	710	81	11,4	19,6	77,4	624	123	19,7	26,3	51,3
BHC	0,25	C.E.	713	67	9,4	17,8	81,4	576	91	15,8	23,4	60,9
BHC	0,10	P.M.	718	74	10,3	18,6	79,7	559	138	24,7	29,8	39,0
Parathion	0,125	C.E.	714	89	12,5	20,7	75,3	612	148	24,2	29,4	40,1
Parathion	0,05	P.M.	675	83	12,4	20,2	75,4	647	146	22,6	28,3	44,1
Testemunha			595	301	50,6	45,4		532	215	40,5	39,4	
Diferença mínima significativa						Nível 5%	6,7				4,6	
						Nível 1%	9,1				6,2	

(*) = Concentrado emulsionável
(**) = Pó mólhável
(***) = Porcentagem de redução em relação à testemunha

ção superior a 80, no que foram acompanhados pelos pós molháveis de Toxafeno e BHC e pelo concentrado emulsionável de Parathion. Da mesma maneira, o pó molhável de Parathion atingiu a uma porcentagem de redução superior a 70.

TABELA 6

Resultados em minas de *Perileucoptera coffeella* em ensaios de pulverizações a baixo volume a intervalos de 3 semanas (4 aplicações) e 5 semanas (3 aplicações). Jaú, Maio-Agosto, 1955

Inseticidas	Porcentagem de principio ativo	Formulação	3 semanas			5 semanas		
			Total de minas	Média de minas p/ parcela	Porcentagem de redução (***)	Total de minas	Média de minas p/ parcela	Porcentagem de redução
Dieldrin	0,40	C.E.(*)	58	14,5	90,4	56	14,0	87,2
Dieldrin	0,16	P.M.(**)	391	97,7	35,6	550	137,5	0,0
Toxafeno	2,00	C.E.	56	14,0	90,8	99	24,7	77,4
Toxafeno	0,80	P.M.	92	23,0	84,8	180	45,0	58,9
BHC	0,25	C.E.	91	22,7	85,0	131	32,7	70,1
BHC	0,10	P.M.	95	23,7	84,3	230	57,5	47,5
Parathion	0,125	C.E.	115	28,7	81,0	236	59,0	46,1
Parathion	0,05	P.M.	125	31,2	79,4	198	49,5	54,8
Testemunha			607	151,7		438	109,5	
Diferença mínima signific.		Nível 5%		43,4			28,9	
		Nível 1%		58,8			39,2	

(*) = Concentrado emulsionável
(**) = Pó molhável
(***) = Porcentagem de redução em relação à testemunha

Em concordância com as conclusões estatísticas para as fôlhas minadas, a análise para minas comprova plenamente o que foi dito anteriormente, porquanto todos os inseticidas, inclusive as pulverizações com Parathion, se bem que tivessem demonstrado relativa superioridade dos concentrados emulsionáveis sôbre os pós molháveis, não diferiram estatísticamente nas formulações, com exceção do Dieldrin.

Os dados de fôlhas minadas contidos na tabela 5, na parte referente ao campo pulverizado de cinco em cinco semanas, evidenciam que apenas o concentrado emulsionável de Dieldrin ultrapassou uma porcentagem de redução de 80, enquanto que os concentrados emulsionáveis de Toxafeno e BHC atingiram a 70% e 60% respectivamente.

Com exceção do pó molhável de Dieldrin, que não se distinguiu estatísticamente da testemunha, os demais tratamentos diferiram de maneira altamente significativa da mesma. Do confronto entre as diversas pulverizações, verifica-se que os concentrados emulsionáveis de Dieldrin e Toxafeno não diferiram estatísticamente entre sí; enquanto o primeiro diferenciou-se de modo altamente significativo dos outros tratamentos, o segundo, tambem diferiu de modo altamente significativo do pó molhável de BHC e das duas formulações de Parathion e apenas significativamente do próprio produto na formulação de pó molhável.

Comparando-se a eficiência dos concentrados emulsionáveis e pós molháveis, quando aplicados com intervalos de cinco semanas, observa-se nítida superioridade para os concentrados emulsionáveis de Dieldrin, Toxafeno e BHC, que se confirmou plenamente pela análise estatística, com diferenças altamente significativas para Dieldrin e BHC e significativa para Toxafeno.

Corroborando com os resultados obtidos em função de fôlhas minadas, os dados expressos em minas (tabela 6) revelam uma porcentagem de redução acima de 80 para o concentrado emulsionável de Dieldrin e de mais de 70 para os concentrados emulsionáveis de Toxafeno e BHC, ficando as outras pulverizações abaixo de 60%.

Estatísticamente, todos os tratamentos, a exceção do pó molhável de Dieldrin, que nem siquer chegou a diferir ao nível fiducial de 5%, diferiram de modo altamente significativo da testemunha.

Se bem que não tivesse diferido estatísticamente do concentrado emulsionável de Toxafeno, o concentrado emulsionável de Dieldrin deu diferenças altamente significativas em relação ao pó molhável de BHC e concentrado emulsionável de Parathion e apenas significativas dos pós molháveis de Toxafeno e Parathion. Por sua vez o concentrado emulsionável de Toxafeno apresentou diferenças estatísticas sòmente ao nível fiducial de 5% com relação ao pó molhável de BHC e concentrado emulsionável de Parathion.

O confronto entre os concentrados emulsionáveis e pós molháveis foi novamente favorável aos primeiros, com exceção do Parathion, no entanto, estatísticamente essa superioridade se confirmou apenas no caso do Dieldrin.

Os resultados conseguidos com a observação suplementar de 22 de Agosto, em que foram examinadas 1.200 fôlhas colhidas ao acaso por tratamento, estão contidos na tabela 7, que tambem expressa as porcentagens de redução em função de minas. Como se pode verificar, no experimento tratado de três em três semanas sòmente o concentrado emulsionável de Dieldrin atingiu a uma porcentagem

de redução superior a 80, enquanto que os demais tratamentos, exceto o pó molhável de Dieldrin, apresentaram redução superior a 70%. Com referência às formulações, apenas o concentrado emulsionável de Dieldrin suplantou nitidamente o respectivo pó molhável, não sendo apreciável essa diferença para o Toxafeno. Contrariamente, os pós molháveis de BHC e Parathion mostraram superioridade aos respectivos concentrados emulsionáveis.

TABELA 7

Resultados em fôlhas minadas e minas da contagem de 1200 fôlhas por tratamento, em ensáios de combate à *Perileucoptera coffeella* com pulverizações a baixo volume a intervalos de 3 semanas (5 aplicações) e 5 semanas (3 aplicações). Jaú, Maio-Agosto, 1955

Inseticidas	Porcentagem de princípio ativo	Formulação	3 semanas			5 semanas		
			Porcentagem fôlhas atacadas	Total de minas	Porcentagem de redução em minas	Porcentagem fôlhas atacadas	Total de minas	Porcentagem de redução em minas
Dieldrin	0,40	C.E.	14,2	218	82,3	18,2	277	75,5
Dieldrin	0,16	P.M.	39,9	711	42,1	54,2	1003	11,3
Toxafeno	2,00	C.E.	18,2	289	76,5	20,7	322	71,5
Toxafeno	0,80	P.M.	19,6	307	75,0	30,6	481	57,5
BHC	0,25	C.E.	18,2	288	76,6	26,8	467	58,7
BHC	0,10	P.M.	16,8	258	79,0	32,2	579	48,8
Parathion	0,125	C.E.	23,4	359	70,8	38,0	759	32,9
Parathion	0,05	P.M.	19,9	323	73,7	30,7	512	54,7
Testemunha			59,3	1229		55,7	1131	

Na mesma tabela 7, ao examinar-se os dados do ensaio a intervalos de cinco semanas, observa-se que sòmente dois tratamentos, na forma de concentrado emulsionável, Dieldrin e Toxafeno, atingiram a uma porcentagem de redução maior que 70, ficando os demais abaixo de 60.

Confirmando todos os resultados anteriores, os concentrados emulsionáveis de Dieldrin, Toxafeno e BHC deram maior eficiência quando comparados com os respectivos pós molháveis, assim como o pó molhável de Parathion em relação ao seu concentrado emulsionável.

DISCUSSÃO

A realização dos experimentos decorreu normalmente, especialmente devido à intensidade de infestação do "bicho-mineiro" ter sido semelhante à observada em média nos cafezais do Estado nos

últimos anos. Outro importante fator que em muito contribuiu para a homogeneidade dos dados experimentais foi a uniformidade da cultura, quer como referência ao porte das plantas como tambem à idade, enfolhamento e inexistência de falhas, dando excelente "stand". A ausência de chuvas nos dias seguintes às pulverizações, bem como regularidade de temperatura e umidade, constituiu fator favorável ao ensáio, evitando possíveis discrepâncias entre os resultados das diversas contagens.

O sistema de amostragem adotado e o modo de considerar a infestação do inseto foram, a nosso vêr, os meios mais convenientes de examinar a eficiência dos inseticidas. Tendo sido eliminadas todas as fôlhas minadas dos galhos etiquetados, os experimentos iniciaram-se com uma infestação nula na ocasião de incidência do ataque do "bicho-mineiro". Dessa forma poude ser observado o incremento progressivo da infestação nas parcelas tratadas e testemunhas, e o comportamento dos diversos inseticidas contra o inseto.

O cômputo de fôlhas minadas e de minas teve em vista apenas a observação da ação geral protetora dos inseticidas contra os danos causados pelo "bicho-mineiro" e não o estudo particular do valor dos mesmos sôbre os adultos (mariposas) ou lagartas no interior das minas. Êsse detalhe do método experimental diferencia o presente trabalho dos precedentes em que o problema foi encarado sob o aspecto da eficiência dos inseticidas sôbre as mariposas (3) e sôbre as larvas no interior das minas (8 e 12).

Que o método de amostragem foi eficiente basta atentar para os dados contidos na tabela 7 referentes à amostragem complementar de 1.200 fôlhas por tratamento, retiradas no período mais crítico da infestação, e compará-los com os das tabelas 5 e 6, que representam as observações, na mesma época, segundo o método de amostragem já descrito. O estudo individual dos diversos tratamentos mostra haver concordância em ambas as tabelas; a relativa constância nas diferenças das porcentagens de fôlhas minadas, sempre maiores na tabela 7, justifica-se pelo fato de terem sido consideradas também as fôlhas minadas existentes antes do início das pulverizações. Como decorrencia, observam-se idênticas diferenças nas porcentagens de redução dessas tabelas, embora os resultados não sejam perfeitamente concordantes.

Com referência à queda de fôlhas dos dois campos experimentais, foi observado, no período de Maio a Outubro, um máximo de redução de fôlhas das plantas em fins de Agosto e início de Setembro, ocorrendo nova brotação em fins dêste ultimo mês. E' interessante observar ainda (tabelas 1 e 2) que a maior intensidade de

ataque do "bicho-mineiro", tanto para o ensaio tratado a intervalos de três semanas como para o tratado a cinco semanas, ocorreu no mês de Agosto. Como se vê, houve coincidência entre as épocas de maior queda de fôlhas e de maior infestação, embora nas parcelas tratadas com os inseticidas mais eficientes — concentrados emulsionáveis de Dieldrin e Toxafeno — a desfolha tenha sido semelhante às parcelas não tratadas. Êsse aspecto do problema, aqui abordado apenas ligeiramente, merece minucioso estudo, a fim de esclarecer a influência do inseto na queda de fôlhas do cafeeiro.

Na apreciação do comportamento dos diversos tratamentos, tomando por base os valores expressos em fôlhas minadas (tabela 5), pode-se fazer diversas observações, mormente sôbre o efeito residual, considerando-se que a intervalos de três semanas a ação dos inseticidas foi mais ou menos semelhante, ao passo que, o mesmo não se deu a intervalos de cinco semanas, quando então alguns dos produtos apresentaram maior ação residual.

O concentrado emulsionável de Dieldrin mostrou ser o tratamento mais eficiente dos testados em ambos os experimentos. Aplicado a intervalos de três semanas atingiu à maior porcentagem de redução, embora não apresentasse diferenças substanciais em confronto com os demais tóxicos; em pulverizações de cinco semanas, não obstante conseguisse porcentagem de redução ligeiramente inferior, 80,8, foi o único tratamento que manteve um elevado índice de eficiência. Excetuando o concentrado emulsionável de Toxafeno, diferenciou-se de modo altamente significativo das demais pulverizações.

Contrariamente, quando na formulação de pó molhável, Dieldrin deu os piores resultados, não se diferenciando siquer ao nivel fiducial de 1% das testemunhas. Essa disparidade entre o obtido com o concentrado emulsionável e o pó molhável talvez se deva atribuir a uma possível deterioração do produto em estoque, o que não poude ser devidamente verificado na ocasião por absoluta falta de recursos para a análise do inseticida, mesmo por parte da firma distribuidora.

Os resultados do Toxafeno mostram nas aplicações a intervalos de três semanas pequena superioridade do concentrado emulsionável sôbre o pó molhável, não obstante não haver significância estatística. Já a intervalos de cinco semanas, o concentrado emulsionável com 69,6 de porcentagem de redução diferiu significativamente do pó molhável com 51,3% de redução. O primeiro, devido à pronunciada ação residual, colocou-se em segundo lugar entre os tratamentos, sendo o único inseticida que não diferiu estatísticamente do Dieldrin na forma de concentrado emulsionável; já o pó molhável de

Toxafeno, com uma porcentagem de redução apenas superior a 50, classificou-se em quarto lugar.

As pulverizações de BHC, como todas as demais aplicadas a intervalos de três semanas, apresentaram resultados satisfatórios para ambas as formulações, enquanto que a intervalos de cinco semanas sòmente o concentrado emulsionável mostrou apreciável eficiência, colocando-se em terceiro lugar. O mesmo não ocorreu, todavia, com o pó molhável, que, com uma porcentagem de redução de 39,0 diferenciou-se desfavoravelmente da emulsão de modo altamente significativo, classificando-se entre os tratamentos menos eficientes.

Fugindo a regra geral, as aplicações de Parathion mostraram estreita semelhança para ambas as formulações nos 2 ensaios, ainda que o pó molhável apresentasse pequena vantagem. Se bem que em aplicações menos espaçadas satisfizessem no combate ao inseto, a intervalos de cinco semanas não evidenciaram efeito residual recomendável ficando aquem dos demais inseticidas, classificando-se o pó molhável e o concentrado emulsionável, respectivamente em 5.º e 6.º lugares.

Ao se analizar o presente estudo em função dos intervalos de aplicação dos inseticidas, evidencia-se que os tratamentos espaçados de três semanas, se bem que houvessem diferido de modo altamente significativo das testemunhas, com exceção do pó molhável de Dieldrin, não apresentaram nenhuma diferença estatística entre si. Assim sendo, não houve, portanto, superioridade de nenhum, apesar de ter havido leves diferenciações nas respectivas porcentagens de redução.

Relativamente às aplicações de cinco semanas, em que se visou principalmente o estudo da ação residual dos inseticidas, o experimento evidenciou que apenas os concentrados emulsionáveis de Dieldrin, Toxafeno e BHC podem ser considerados recomendáveis no combate ao "bicho-mineiro", visto que os demais tratamentos ficaram abaixo de 60% de redução, valores que não julgamos razoáveis quando se trata do combate a um inseto com as características do *Perileucoptera coffeella*.

CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados dêstes dois ensaios de campo, as conclusões obtidas podem ser assim enumeradas:

1) Os inseticidas aplicados na formulação de concentrados emulsionáveis, de modo geral apresentam melhores resultados no combate ao "bicho-mineiro" que os respectivos pós molháveis. Embora a pequenos intervalos de tratamentos (3 semanas) essa supe-

rioridade não seja marcante, o ensaio a intervalos de 5 semanas evidenciou plenamente êsse detalhe para três dos quatro inseticidas experimentados. Os concentrados emulsionáveis de Dieldrin e BHC chegam a ser altamente expressivos, enquanto o do Toxafeno é apenas significativo. Os tratamentos com Parathion nos 2 ensaios, nas duas formulações, praticamente se equivaleram.

2) O intervalo de 5 semanas entre duas pulverizações constitue o espaçamento mais recomendável em vista dos ótimos resultados conseguidos. A aplicação do Dieldrin, Toxafeno ou BHC na formulação de concentrados emulsionáveis e ao nível de dosagem do presente estudo, satisfaz plenamente no combate por manter as populações em níveis não prejudiciais a cultura.

3) Os tratamentos a intervalos de 3 semanas, embora conduzam a melhores resultados no contrôle em confronto com os tratamentos de 5 semanas, não demonstraram significância capaz de compensar a maior despesa decorrente.

4) Dependendo das condições climáticas e da intensidade de infestação do ano, há necessidade de serem praticadas normalmente três, ou no máximo quatro pulverizações, a partir do período de Abril a Maio, a fim de garantir a cultura até o início da nova brotação.

HIGH CONCENTRATE SPRAYS ON COFFEE LEAF MINER CONTROL, *PERILEUCOPTERA COFFEELLA* (GUÉRIN-MÉNEVILLE) (LEPIDOPTERA-BUCCOLATRICIDAE).

Abstract

This paper dealts with field investigation on the possibility of the use of modern insecticides to control the coffee leaf miner pest — Perileucoptera coffeella.

Since previous tests had shown that sprays are more effective than dusts, due especially to the capacity of certain products to kill the larvae in the interior of the mines, the authors, by using concentrated or low-volume sprays, tested in field trials the efficacy of four of the most promising insecticides for the control of this insect, applying them at intervals of three and five weeks and using two formulations — wettable powder and emulsifiable concentrate.

The design chosen for the layout of the experiment was that of randomized blocks with four replications, each block containing nine treatments including the untreated check. The experimental unit was a plot of six usable bushes completely surrounded by two rows of border bushes. A total of 832 bushes were used in the experiment.

In the differents treatments the following percent concentrations of the active ingredient were used: — Emulsifiable Concentrates-BHC at 0.25, Dieldrin at 0.40, Parathion at 0.125, and Toxaphene at 2.00; Wettable Powders-BHC at 0.10, Dieldrin at 0.16, Parathion at 0.05, and Toxaphene at 0.80.

In the application of the insecticides knapsack spravers were used, equipped with Teejet X-2 nozzles for the emulsifiable concentrates and D-2 nozzles for the wettable powders. Applications were made at the rate of 160 cc. per tree for the emulsifiable concentrate solution sprays and 400 cc. for the wettable powder suspensions.

The number of sprays was nine in the field treated at three-week intervals and five in that treated every five weeks. The insect countings were always made twenty-four hours before the treatments, recording the total number of leaves on previously tagged branches as well as the total number of mines and mined leaves.

The conclusions based on the results obtained from the tests can be summarized as follows:

1. The insecticides applied in the form of emulsifiable concentrates in general gave better results in the control of the coffee leaf miner than the respective wettable powders. Nevertheless, in the treatment made at short intervals (three weeks) this superiority was not so marked. The test with treatments made at five-week intervals definitely showld the superiority of the emulsifiable concentrates for three of the four insecticides tested.

2. The five week intervals between spraying seemed to be the most recommendable spacing in view of the excellent results obtained.

3. The application of the Dieldrin, Toxaphene, or BHC in the form of emulsifiable concentrates and at the rate used in the present study gave fully satisfactory control to maintain the leaf miner population under the injury level.

4. The treatments at three-week intervals, although giving better control results as compared with the treatments at five-week intervals, did not show enough difference to compensate for the greater expenses incurred.

5. Based on the data obtained it may be said that depending on climatic conditions and the intensity of the infestation in a given year, it might be necessary under normal farming conditions to apply three, or a maximum of four sprayings, starting in April-May, in order to protect the coffee plants until the beginning of the new budding period.

BIBLIOGRAFIA

1) Abbot, W. S. — 1925 — A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, Menasha, U. S. A., 18: 265-267.

2) Amaral, S. F. — 1953 — Considerações sôbre o "bicho-mineiro" e sua importância econômica. *O Biológico*, S. Paulo, 19: 85-92.

3) Amaral, S. F. — 1956 — Porque BHC com mais de 1% no contrôle do bicho-mineiro? *O Biológico, S.* Paulo, 22: 39-45.

4) Bliss, C. I. — 1937 — Plant protetion. 12, Leningrado.

5) Fonseca, J. P. — 1944 — O "bicho-mineiro" das fôlhas do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville). *O Biológico*, S. Paulo, 10: 253-258; 298-303; 329-338.

6) Fonseca, J. P. — 1949 — O "Bicho-mineiro" das fôlhas do café e seu combate. *O Biológico*, S. Paulo, 15: 167-172.

7) Mendes, L. O. T. — 1940 — Os parasitas do "bicho-mineiro" das fôlhas do café", *Leucoptera coffeella* (Guér-Mén. 1842). *Revista do Inst. do Café do Estado de S. Paulo*, 25: 6-12.

8) Sauer, H. F. G. — 1953 — Efeito dos inseticidas orgânicos sôbre as larvas do bicho-mineiro do café no interior das galerias. *O Biológico*, S. Paulo, 19: 57-59.

9) Seixas, C. A. — 1950 — Noticias sôbre duas pragas do café: A broca do café; Bicho mineiro das fôlhas do cafeeiro. *O Biológico*, S. Paulo, 16: 216-217.

10) Seixas, C. A. — 1952 — O "bicho-mineiro" das fôlhas do cafeeiro e seu combate pelos polvilhamentos e adubações. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café*, S. Paulo, 27 (302): 325-328.

11) Speer, M. — 1949 — Observações relativas a biologia do "bicho-mineiro" das fôlhas do cafeeiro, *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Meneville) *(Lepidoptera-Buccolatricidae). Arq. do Inst. Biológico*, S. Paulo, 19: 31-47.

12) Vasconcellos, F. T. C., L. Leiderman e H. F. G. Sauer — 1954 — Estudo da ação de vários inseticidas orgânicos sôbre o "bicho-mineiro" do café no interior das minas. *O Biológico*, S. Paulo, 20: 165-169.

13) Wolcott, G. N. — 1947 — A quintessence of sensitivity: The coffee leaf miner. *Jour. of Agric. of University of Puerto Rico*, 3: 215-219.

———o———

TRÊS NOVAS ESPÉCIES DE COCCIDEOS DO BRASIL, SÔBRE CAFEEIRO *(HOMOPTERA-COCCIDAE)*

POR

José Pinto da Fonseca

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 14 figuras no texto e a estampa 3

Cerecoccus catenarius nov. sp.

Fêmea adulta — Corpo envolto por carapaça cerácea, pardo-clara, de consistência córnea, muito resistente, semiglobular, contôrno basal quasi elíptico, superfície dorsal muito convexa, opáca e ligeiramente aspera. Sôbre a carapaça notam-se numerosas excrescências tuberculiformes, levemente alargadas na base e bruscamente terminadas em ponta obtusa e voltada em direção à região inferior da carapaça. Apresentam-se essas excrescências posição e direção irregulares, porém, com tendência a formarem séries longitudinais de tubérculos, uma série sôbre a região dorsal e três outras lateralmente, em carreiras pouco regulares. Orla marginal basal ligeiramente alargada e provida de tubérculos afilados para a extremidade apical, ponteagudos, dirigidos para a base da carapaça, tomando as margens desta aspeto de denteação. Dêsses tubérculos, dois acham-se situados um de cada lado, na região posterior, são bissulcados superiormente, em sentido longitudinal, trazendo os sulcos uma secreção branca; dois outros tubérculos, idênticos aos primeiros, encontram-se na região anterior, porém providos de um único sulco. Os indivíduos adultos trazem, junto à margem posterior, diminuto orifício circular situado na extremidade de pequena protuberância, abertura essa por onde se libertam as larvas.

O inseto adere firmemente a casca da planta e localiza-se ao longo da haste, conservando, geralmente, a região anterior voltada em direção à extremidade superior da haste. Há uma tendência para os indivíduos se fixarem em série, aderentes um ao outro pela extremidade posterior, formando cadeia.

A coloração da carapaça aproxima-se a da que se observa na casca da planta, na qual se encontra o inseto.

Dimensões: — A carapaça, dos indivíduos adultos, varia de tamanho entre 3 a 7 milímetros de comprimento; 2 a 5 milímetros de largura e 2 a 4 milímetros de altura. Medições efetuadas em 16 indivíduos, revelaram as seguintes médias: comprimento, 5,1 milímetros; largura, 4,0 milímetros; altura, 2,90 milímetros.

Desprovido do envólucro protetor, o corpo do inseto, vivo, apresenta-se de consistência móle, flexível, de formato mais ou menos globular e de côr que varia de pardo-suja a roxo-clara.

Após a desóva, o corpo do inseto, que antes ocupava toda a cavidade formada pela carapaça protetora, retrai-se e toma um terço do espaço da cavidade, junto à região anterior desta; nesta fase, apresenta-se de côr castanho-escura, liso e luzidio na região superior; visto pela parte superior, o contôrno marginal se mostra irregular, a região ventral com acentuada reintrância posterior, tornando-se reniforme; segmentos abdominais distintamente delimitados; mar-

gens laterais ligeiramente depressas, dilatadas e levemente marginadas. Em alguns indivíduos, observam-se depressões correspondentes às incisões estigmáticas.

Depois de tratado pela solução KOH a 10%, torna-se o corpo do inseto de formato levemente subcircular ou oval, derme transparente, revelando leve quintinização na região das placas anais. Pernas ausentes. Rostro bem desenvolvido, cônico, localizado entre os dois pares de espiráculos; labium bisequimentado, segmento apical trazendo várias sêdas sensoriais; laço rostral ultrapassando a extremidade abdominal. Antenas mais aproximadas entre si do que das margens anterior e laterais, medindo 27,0 micra de comprimento, por 28,0 micra de largura, tão longas quanto largas, com reduzida proeminência terminal, esta com a aparência de um segundo segmento; região basal ligeiramente mais curta do que larga; região apical trazendo, aparentemente, alguns espiráculos, e provida de 6 a 7 sêdas, das quais algumas se apresentam mais longas do que outras. Estígmas desenvolvidos, implantados próximos às depressões laterais, providos de atrum delgado, abrindo-se superiormente em ampla cavidade, com beirada; traqueas espiraculares alongadas, multiformes e em número que varia entre 9 a 13; glândulas peristigmáticas anteriores e posteriores agrupadas conforme mostram as figuras.

Nas regiões meso e metatorácica ventrais observam-se numerosas traqueas, dispostas aos lados e ao longo da região central, algumas simples, outras bifurcadas, relativamente alongadas, de taenidias grossas. O número dessas traqueas vária, de indivíduo para indivíduo, de 7 a 9 em cada lado.

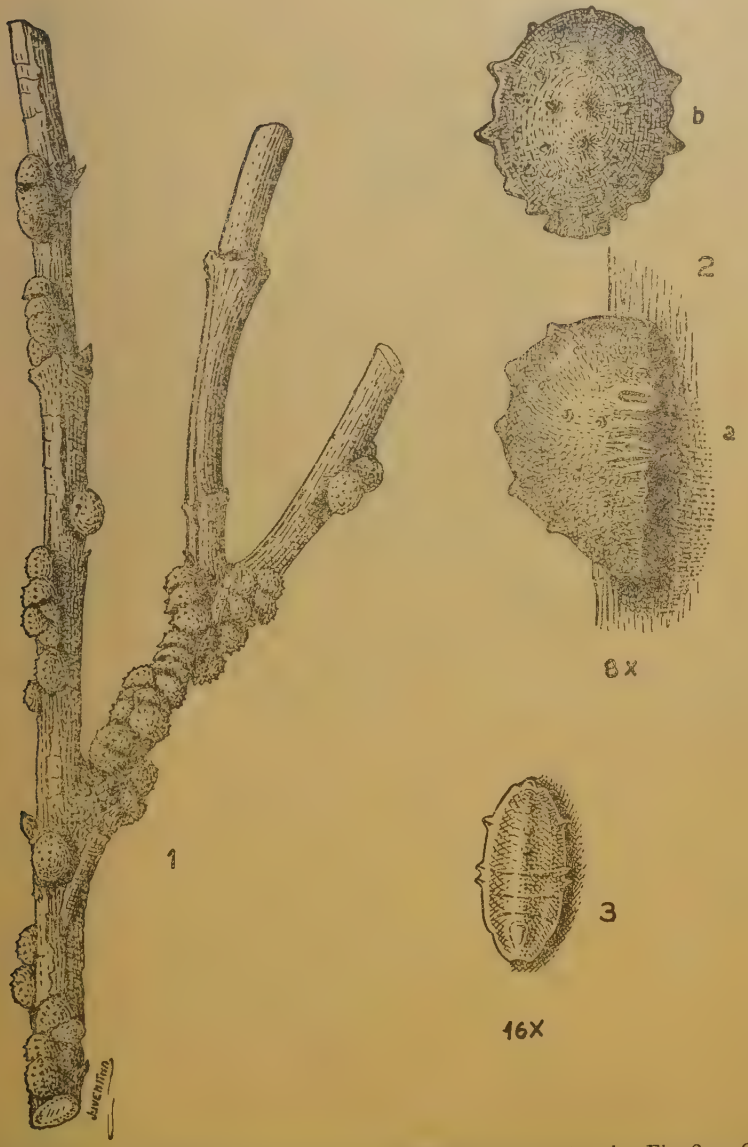
Sôbre o abdomen, numerosos espiráculos implantados na junção dos segmentos, distribuidos longitudinalmente em duas carreiras de cada lado, a partir do quarto segmento.

Face dorsal provida de pequenas glândulas tubulares e de glândulas em forma de 8, estas uniformemente distribuídas.

Placas cribiformes bem desenvolvidas, de tamanho variável no mesmo indivíduo, dispostas em dois grupos assimétricos, de 4, 5, 6, 7 e 9 elementos cada um.

Região ventral meso e metatorácica central ocupada por uma área relativamente ampla, na qual se observam células translúcidas, ovaladas, trazendo no centro um poro simples. Esta areolação se apresenta um tanto dispersa na região central, porém, mais serrada na periférica. Fóra dessa área central, por toda a região ventral, observam-se glândulas em 8 e glândulas tubulares, idênticas às da região dorsal, estando àquelas tambem presentes na área central. Metatorax com 8 espiráculos, alguns com traqueas duplas; mesotorax com 10 espiráculos. Segmentação abdominal distinta, cada segmento trazendo um par de espiráculos nas extremidades. Sôbre o 6.º segmento serrada acumulação de póros biloculares (em 8) dispersamente dispostos. Margem do corpo, na região ventral, a partir do terceiro segmento abdominal, trazendo, de cada lado, uma série de espiráculos curtos. Placa anal cuneiforme, com a extremidade ligeiramente arredondada, provida de 3 pequenos espinhos. Implantados na base inferior das placas anais, encontram-se 2 pares de sêdas, dos quais o basal é composto de sêdas robustas, alongadas, e o segundo de sêdas menores. A placa anal méde, aproximadamente, dois terços do comprimento dos lóbulos anais.

Lóbulos anais bem desenvolvidos, cônicos, ligeiramente arqueados para o lado externo, cilíndricos, depressos na região interna (depressão esta que ocupa dois terços do comprimento total dos lóbulos); extremidade apical cônica, divergente; região ventral transversa e grossamente rogulosa, trazendo na margem



Cerococcus catenarius nov. sp.: Fig. 1 — Haste de cafeeiro atacada; Fig. 2 — Carapaça da fêmea (vistas lateral e superior): Fig. 3 — Carapaça do macho (vista superior).

Cerococcus catenarius nov. sp. — Corpo da fêmea adulta; Fig. 4; a - Espiráculos; b, c - Glandulas peristigmáticas; a - Ducto tubular; e - Placas cribiforme; f - Glandulas em 8; Fig. 3; h - Traqueas; i - Celúlas translúcidas.

Cerococcus catenarius nov. sp.: Fig. 6 — Lóbulos anais

inferior, de cada lado, 3 a 4 pêlos cerdiformes, levemente voltados para a extremidade posterior dos lóbulos; extremidade posterior interna trazendo, em cada lado, 2 espinhos robustos, curtos e um pouco inclinados para a região apical dos lóbulos; região externa glandulosa, provida de poucas sêdas e de póros em 8, os quais acham-se em maior número junto à margem anterior interna dos lóbulos; região terminal de cada lóbulo trazendo, cada uma, uma sêda longa, às vêzes divergentes.

Anel anal de forma mais ou menos circular, provido de 8 sêdas.

Macho: — Adulto desconhecido. O casulo se apresenta de formato oblongo alongado, depresso, arredondado nas extremidades, de côr carmin-clara, medindo 2 milímetros de comprimento, por 1 milímetro de largura.

Localizam-se os casulos ao longo da haste do cafeeiro, muito junto uns dos outros, formando densa aglomeração. O adulto se liberta por uma fenda praticada na região anterior do casulo.

Habitat: — Encontrado em Pirajú, Estado de São Paulo, e em Maringá, Estado do Paraná, sôbre cafeeiro, (*Coffea arábica*) e feijão guandú (*Cajanus indicus*).

Material típico: — Incorporado às coleções do Instituto Biológico de São Paulo, sob o número 4205.

Coccus brasiliensis nov. sp.

Fêmea adulta: — Especimen vivo de forma oblonga-oval, contôrno um pouco alargado para a região cefálica, ligeiramente depresso aos lados dos olhos; face dorsal convexa; margens laterais com fraca depressão; derme flexivel, luzidia e translúcida. Coloração fundamental variando de verde-pálida a acinzentada, tornando-se mais escura à medida que o indivíduo avança em idade. Mascarando a coloração fundamental, percebem-se, internamente, por transparência, garatujas escuras, estreitas, que se reunem desordenadamente, deixando áreas claras, de forma areolada e irregularmente distribuídas por toda a superfície do corpo. Em muitos indivíduos, o contôrno marginal do corpo não é atingido pelas rêdes de manchas escuras, conservando a coloração fundamental. Olhos pretos, arredondados, marginais e diminutos.

Dimensões: — O tamanho dos indivíduos adultos, vivos, vária entre 3,51 milímetros de comprimento, 3 a 4 milímetros de largura e 2 a 3 milímetros de altura. As médias encontradas em 12 indivíduos, foram: comprimento, 3,3 milímetros; largura, 3,51 milímetros e altura, 2,9 milímetros.

Tratado pela solução KOH a 10%, torna-se o corpo do inseto de formato oblongo, ligeiramente atenuado na região cefálica.

Antenas de 8 segmentos, com as seguintes medidas, em micra: I, 27,0; II, 36,0; III, 51,0; IV, 36,0; V, 36,0; VI, 27,0; VII, 27,0; VIII, 45,0. Sôbre as antenas observam-se 2 sêdas curtas no primeiro segmento; 2 outras curtas e uma longa no sexto segmento; 1 longa no sétimo e 1 curta e 6 longas no oitavo segmento. Destas últimas, duas sêdas se apresentam mais espessas. Entre as antenas, a partir da inserção destas, próximo a cada antena, observam-se 4 a 6 sêdas, das quais, duas ou três do centro se apresentam mais longas e mais espêssas. Pernas com as coxas providas de 2 sêdas implantadas no lado interno, uma na seção basal, outra na região apical e 2 outras externamente, obedecendo

as mesmas disposições; trocanteres com 2 sêdas alongadas, uma na região apical inferior, e outra, mais curta, internamente; fêmures com duas pequenas sêdas uniformemente distribuídas, e uma sêda mais longa, junto à extremidade apical externa; tíbias com 5 a 7 sêdas curtas, duas na seção basal externa e as demais na região apical; digítulos tarsais finos e alongados, mais afilados para a extremidade apical; digítulos das unhas não chegando a medir duas vezes o comprimento destas, dilatados nas regiões basal e apical. As pernas apresentam as seguintes dimensões: I par-coxas, 90,0; trocanteres, 84,0; fêmures, 117,0; tíbias, 108,0; tarsos, 67,0; unhas, 27,0; digítulos tarsais, 45,0; digítulos das unhas, 36,0.

II par-coxas, 127,0; trocanteres, 54,0 fêmures, 138,0; tíbias, 117,0; tarsos, 81,0; unhas, 27,0; digítulos tarsais, 54,0; digítulos das unhas, 36,0.

III par-coxas, 127,0; trocanteres, 72,0; fêmures, 141,0; tíbias, 140,0; unhas, 27,0; digítulos tarsais, 64,0; digítulos das unhas, 36,0. Sêdas do contôrno marginal dorsal relativamente curtas, espessas, distribuidas em distâncias uniformes, e apresentando-se alargadas e denteadas (7 a 9 dentes) no ápice. Na margem externa da face inferior, em disposição mais ou menos idêntica à que se observa na face superior com as sêdas denteadas, observa-se grande número de sêdas curtas e finas, espiniformes, uniformemente distribuídas e assentadas sôbre uma base aureolada.

Tarsos anteriores, em alguns indivíduos, trazendo, na face dorsal, leve constrição transversal. Fenda anal medindo um quinto do comprimento do corpo. Placas anais com ângulos externos arredondados, margens anteriores direitas; margens posteriores levemente convexas; região apical superior provida de 4 sêdas curtas, duas na extremidade apical e duas um pouco mais afastadas, dorsalmente. Superfície inferior basal das placas anais trazendo 4 sêdas, duas de cada lado; margens laterais providas de 3 a 5 sêdas, em direção apical das placas. Anél anal com 8 sêdas.

Canaes estigmáticos fracamente depremidos, pouco conspicuos; depressões estigmaticas de altura ultrapassando ligeiramente o comprimento dos espinhos menores estigmáticos; espinhos estigmáticos fortes, ponteagudos; o espinho mediano, em alguns indivíduos, medindo mais de duas vêzes o comprimento dos espinhos menores; glândulas quinqueloculares, ao longo das depressões estigmáticas, em número de 15 a 21, irregularmente dispostas em carreira. Glândulas multiloculares circungenitais em número de 4, duas de cada lado. Células dermais de tamanho variado, de formato oval e arredondado, apresentando-se maiores e mais acumuladas na região circunlateral interna, tornando-se menores e de distribuição mais espaçada na região central e na órla marginal do corpo.

Habitat: — Encontrada em Botucatú, Estado de São Paulo e na cidade de São Paulo, sôbre cafeeiro.

Material típico: — Incorporado às coleções do Instituto Biológico de São Paulo, sob números, 4272, 4274 e 4275.

Esta espécie é muito próxima de *Coccus africanus* (Newstaed), da qual se distingue pela convexidade mais pronunciada da face dorsal, e, sobretudo, pela disposição das células dermais, intensamente acumuladas nas regiões circunlaterais do corpo. Estas células, ao contrario, em *Coccus africanus*, apresentam-se espalhadas, distribuídas por toda a superfície da derme dorsal.

Material de *Coccus brasiliensis*, coletado nas partes aéreas e subterrâneas de cafeeiro, (n. 4274 e 4275), remetido ao Dr. W. J. HALL, diretor do Commonwealth Institute of Entomology, Londres, e pelo Dr. D. J. WILLIAMS comparado com a espécie *Coccus africanus*, evidenciou-se tratar-se, realmente, de espécie diferente.

Por especial obséquio do Dr. G. DE LOTTO, entomologista do Scott Agricultural Laboratóries, Department of Agriculture, Narobi, Kenya, recebemos copioso material de *Coccus africanus*, o qual, comparado com o material aqui encontrado sôbre cafeeiro, confirmou nosso ponto de vista, de se tratar, nosso material, de uma nova espécie do gênero *Coccus*.

No cafeeiro, localiza-se o inseto nas partes aéreas, tanto sôbre as hastes como na base do tronco, e nas partes subterrâneas. Nas partes aéreas reunem-se em colônias compactas, que são, muitas vêzes, protegidas por uma capa de terra, formada por formiga do gênero *Solenopsis*.

Nas partes subterrâneas, localiza-se o *Coccus brasiliensis* tanto nas raízes mais grossas, como nas mais finas. Em ambas, acha-se o inseto protegido por um micélio de um fungo que envolve toda a colônia, tomando o formato de nodosidades, como que pequenas esferas, distintas umas das outras, porem aproximadas, formando uma crosta continua, á qual, geralmente, chega a envolver toda a raís.

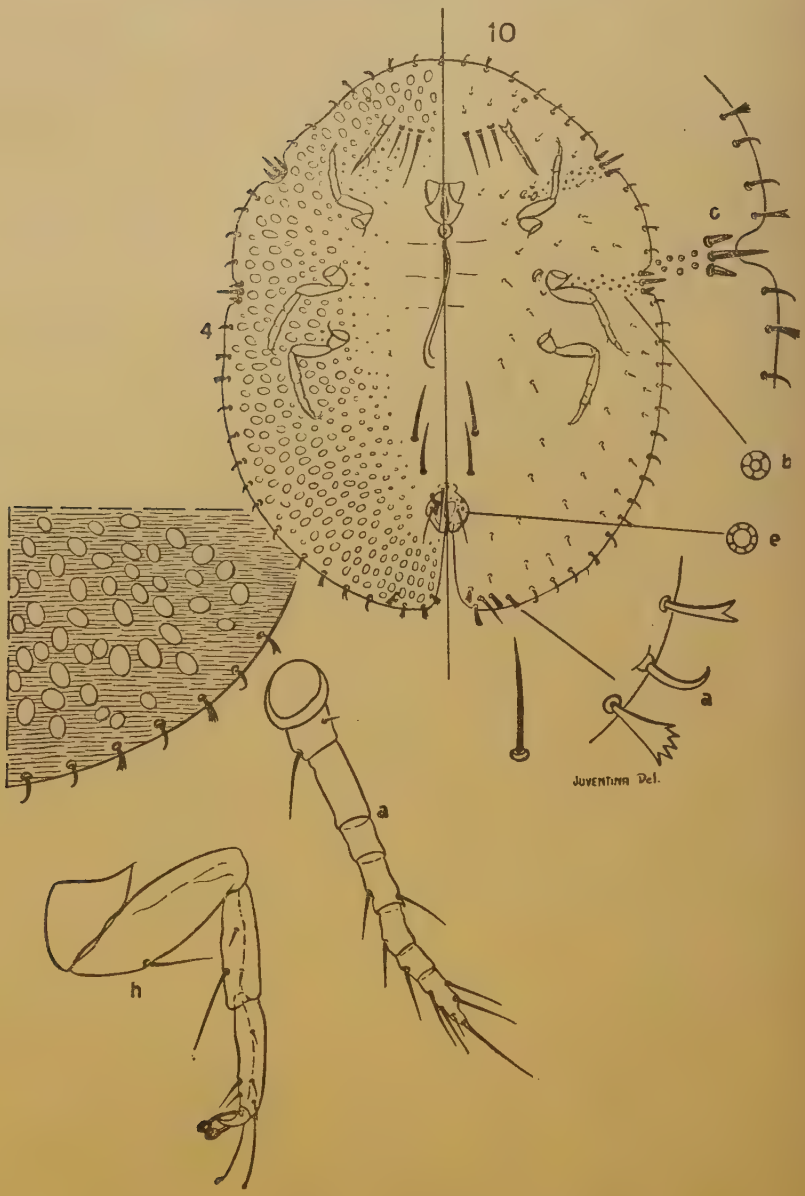
Cada nodosidade adére a casca da planta e traz, internamente, o inseto, em número de dois a três indivíduos. O tamanho das nodosidades vária de 7 milímetros a 1 centímetro de diâmetro, e elas se apresentam de consistência e aspecto coríáceo, de coloração externamente mais ou menos pardo-acinzentada, e branca internamente.

Em diversos cafeeiros em que se observou a presença do *Coccus brasiliensis*, nas raízes, também se encontrou o *Pseudococcus comstock*, porém alojado em nodosidades separadas. Dêsse fato, pode-se concluir pela identidade de *Boletus tropicus* RICT, 1939, assinalado em 1940 por C. R. GONÇALVES, na Baixada Fluminense, formando criptas protetoras de *Pseudococcus comstock*, com o fungo óra observado com o *Coccus brasiliensis*.

Aos Snrs. Dr. W. J. HALL e Dr. J. WILLIANS, Diretor do Commonwealth Institute of Entomology, Londres, e ao Dr. G. DE LOTTO, do Scott Agricultural Laboratóries, Department of Agriculture, Narobi, Kenya, consignamos aquí os nossos agradecimentos.

Coccus brasiliensis nov. sp.: Fig. 7 — Haste de cafeeiro atacada; Fig. 8 — Raiz de cafeeiro atacada.

Coccus brasiliensis nov. sp.: Fig. 9 — Fêmea adulta; Fig. 11 — Placas anais.



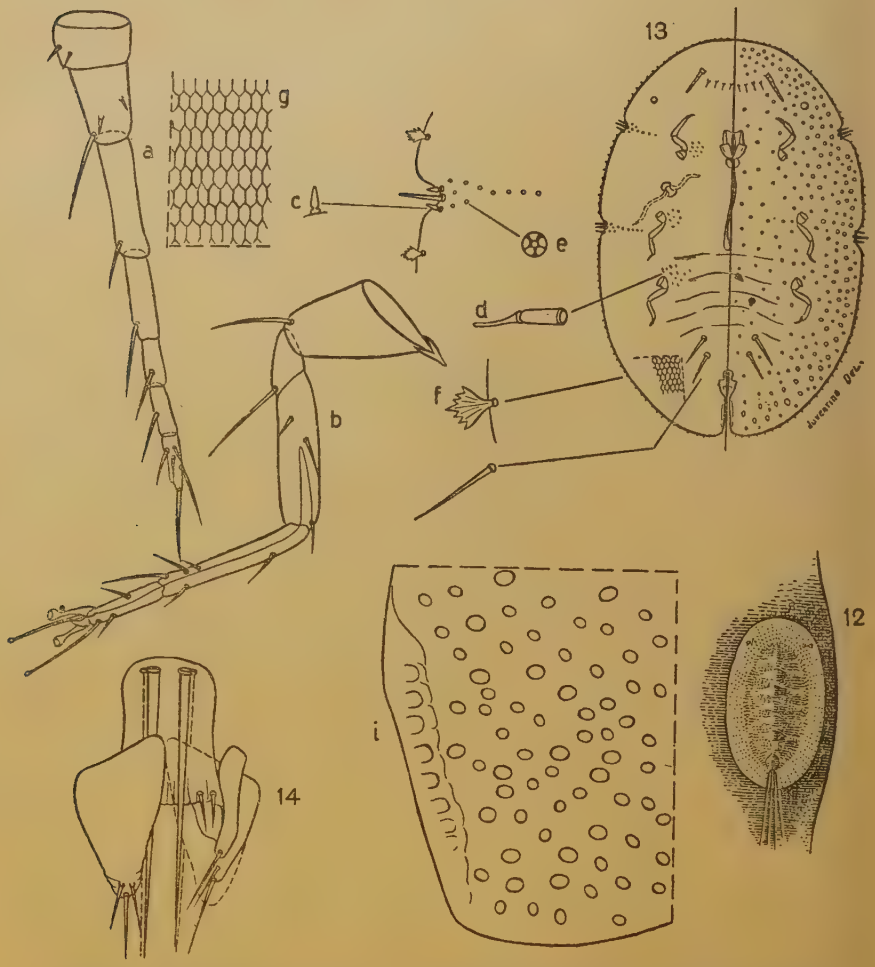
Coccus brasiliensis nov. sp.: Fig. 10 — Corpo da fêmea adulta: a - Antena; b - Glândulas quinqueloculares; c - Espinhos estigmáticos; d - Sêdas franjadas; e - Glândulas multiloculares; f - Celúlas dermais.

Lecanium lizeri nov. sp.

Fêmea adulta: — Corpo de forma oval, ligeiramente atenuado na região anterior, arredondado posteriormente; derme liza, luzidia e resistente; regiões laterais providas de leve granulação fina; superfície superior um tanto convexa, percorrida por fraca quilha mediana, longitudinal; transversalmente, algumas corrugações fracas; margens ligeiramente depressas. Côr castanho-clara, com larga faixa marginal mais escura. Olhos pretos, irregularmente arredondados, situados próximos à margem do corpo. Placas anais castanho-escuras. Nascendo junto à abertura anal, observam-se 3 a 4 longos apêndices filamentosos, brancos. Êstes, nos indivíduos mais novos, medem quasi duas vêzes o comprimento do corpo, e, nos indivíduos completamente desenvolvidos, seu tamanho excede um pouco mais da metade do comprimento do corpo. Margens da fenda anal levemente marginadas.

Dimensões: — Os indivíduos adultos medem 3-5 milímetros de comprimento, e 2-3 milímetros de largura.

Tratados pela solução KOH a 10%, conserva o corpo formato idêntico ao apresentado no indivíduo vivo. Antenas de 7 segmentos, com as seguintes medidas, em micra: I, 27,0; II, 54,0; III, 99,0; IV, 81,0; V, 36,0; VI, 36,0; VII, 63,0. Sobre as antenas observam-se, no mínimo, 13 sêdas: 3 curtas, na base do primeiro segmento; 1 curta e 1 longa na seção apical do segundo segmento; 2 curtas na seção apical do terceiro segmento; 1 longa e 1 curta no terço apical do quarto segmento; 1 longa na região central do quinto segmento; 1 longa na região central do sexto segmento; 5 longas no sétimo segmento, das quais, a mais longa, se encontra na extremidade apical. Sêdas entre as antenas em número de 4 a 5 para cada antena, de tamanho variado, sendo de maior tamanho as que se encontram mais afastadas da base das antenas. Pernas com coxas, trocanteres, fêmures e tíbias, providos de sêdas robustas na extremidade apical. Tíbias e tarsos providos de sêdas nas extremidades; digítulos tarsais e das unhas de formato usual. As pernas apresentam as seguintes dimensões: I par-coxas, 90,0; trocanteres, 81,0; fêmures, 162,0; tíbias, 135,0; tarsus, 90,0; digítulos, 54,0; unhas, 18,0; digítulos 36,0; II par-coxas, 126,0; trocanteres, 90,0; fêmures, 191,0; tíbias, 102,0; tarsus, 108,0; digítulos, 63,0; unhas, 18,0; digítulos, 54,0; III par-coxas, 135,0; trocanteres, 90,0; fêmures, 180,0; tíbias, 149,0; tarsos, 108,0; digítulos, 63,0; unhas, 18,0; digítulos, 54,0. Sêdas do contôrno marginal dorsal, curtas, alargadas e denteadas na extremidade apical, trazendo de 6 a 7 dentes. Estas sêdas acham-se distribuídas equidistantemente umas das outras. Em sentido paralelo às sêdas franjadas, do contôrno marginal, observam-se sêdas curtas, finas, espiniformes, distribuídas regularmente sob a margem do corpo. Fenda anal medindo a sétima parte do comprimento do corpo. As margens da fenda anal são espessas em toda a sua extensão e, superiormente, providas de uma sinuosidade irregular. Placas anais mais longas do que largas, sensivelmente atenuadas para a extremidade apical, fracamente concavas nas margens anterior, exterior e interna; ângulos externos arredondados; região apical levemente truncada, escabrosa e provida de 3 a 4 sêdas finas; superfície inferior basal provida de 4 sêdas curtas, duas de cada lado; margem laterais com 3 sêdas alongadas, um pouco inclinadas para a extremidade apical das placas. Anél anal com 6 sêdas. Canais estigmáticos pouco conspicuos; cavidades estigmáticas pouco profundas, com os cantos levemente arredondados; espinhos estigmáticos fortes, ponteagudos, o mediano levemente curvado, medindo três vêzes o comprimento dos espinhos menores; espinhos menores ponteagudos, alargados na região mediana;



Lecanium lizeri nov. sp.: Fig. 12 — Fêmea adulta; Fig. 13 — Corpo da fêmea adulta: a - Antena; b - Perna; c - Espinhos estigmáticos; d - Ducto tubular; e - Glândulas quinqueloculares; f - Sedas franjadas; g - Reticulação hexagonal; i - Margem da fenda anal e celulas dermais; Fig. 14 — Placa anal.

glândulas quinqueloculares distribuídas esparsamente ao longo da sutura estigmática, em número de 3 a 4 junto às depressões estigmáticas. Células dermais de tamanho variado, as maiores de formato mais ou menos oval, as menores arredondadas, distribuídas irregularmente, em maior número na região marginal do corpo. Reticulação dificilmente visível, de formato hexagonal alongado. Sedas da região superficial basal das placas, em número de 4, duas de cada lado. Superfície central ventral provida de 8 agrupamentos de ductos tubulares, situados, um próximo a cada perna dos pares anterior e mediano, e dois próximos aos pares posteriores. Êstes ductos se apresentam voltados em várias direções, reunidos, e de dois formatos: ductos simples e ductos providos de apêndice delgado, implantado na extremidade apical, como se vê na figura.

Habitat: — Campinas, Estado de São Paulo, sôbre fôlhas de cafeeiro provenientes do Instituto Agronomico. O inseto, em geral, localiza-se, na página inferior da fôlha, ao longo das margens externas.

Material típico: — Incorporado às coleções do Instituto Biológico de São Paulo, sob número 4283.

A presente espécie é afim de *Lecanium caudatum* GREEN, de Ceylão, da qual difere (a julgar pela descrição do autor), pelos seguintes caracteres: Células dermais mais agrupadas na seção marginal do corpo; reticulação em hexagonal alongada; margens da fenda anal espessa e marginada; espinhos menores das depressões estigmáticas espêssos na região central, atenuados para as extremidades, e, finalmente, pela presença, na superfície central do corpo, de 8 grupos de ductos, juntos aos três pares de pernas.

Ao conceituado coccidologista Professor CARLOS A. LIZER J. TRELLES, dedico a presente espécie.

THREE NEW SPECIES OF BRAZILIAN COCCIDAE ON COFFEA TREES *(HOMOPTERA-COCCIDAE)*.

Abstract

In the present paper, the following three species are described as new: Cerococcus catenarius, Coccus brasiliensis and Lecanium lizeri. All the species were colleted in the State of São Paulo, Brazil, on coffee trees. (Coffea arabica).

ESTAMPA — 3

Fig. A — *Cerococcus catenarius* nov. sp.
Haste de cafeeiro atacada.

Fig. B e C — *Coccus brasiliensis* nov. sp.
Haste e raís de cafeeiro atacados.

C
B
A

Vol. 24 — Artigo 10 Novembro de 1957

ENSAIOS PARA SELEÇÃO DE SUBSTÂNCIAS, SOB FORMA LÍQUIDA, COMO ATRAENTES PARA A "MOSCA DO MEDITERRÂNEO" — *CERATITIS CAPITATA* (WIED.)

POR

D. Puzzi e A. Orlando

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 11 tabelas no texto

Desde as primitivas campanhas encetadas com o fim de proteger os frutos do ataque das "moscas das frutas", dois caminhos principais foram divisados pelos investigadores. O primeiro relaciona-se com o combate aos adultos pela aplicação diréta, sôbre as plantas, de substâncias atrativas envenenadas. O segundo meio, também muito difundido, basea-se na caça aos adultos pelo emprego de frascos diversos, contendo substâncias atraentes e distribuidos pelas culturas. Muitas vezes foi sugerida a aplicação simultânea dos dois processos.

Encontramos na literatura universal inumeros e exaustivos trabalhos sôbre ambas as questões, entretanto, um estudo comparativo e submetido a uma análise estatística da eficiência de substâncias atrativas em frascos "caça moscas" não nos foi dado a oportunidade de verificar. Entre nós destacamos os estudos de GONÇALVES (3) e GOMES (2).

No presente trabalho visamos aumentar as informações necessárias para o nosso meio, procedendo a um estudo comparativo de muitas substâncias aqui disponíveis e economicamente utilizaveis para tal finalidade.

Quanto ao emprego dos "caça moscas" para o combate às "moscas das frutas" iremos mais tarde divulgar os resultados que óra estão sendo obtidos em trabalhos em andamento, baseados nas conclusões obtidas nos atuais experimentos.

Entretanto, independente dos resultados obtidos sôbre a parte de contrôle, achamos interessante uma divulgação das nossas atuais conclusões, pois êsse processo de caçar as moscas das frutas, tem grande aplicação nos estudos de ecologia da praga (Migração e Intensidade de população) e é principalmente utilizado para indicar a presença da praga na cultura a fim de se iniciar os tratamentos dos pomares, contra os tripetidios, pelo emprego de pulverizações (7) (5), evitando assim aplicações prematuras e desnecessárias. Com

o uso dos "caça moscas" determina-se com bastante exatidão quando iniciar as primeiras aplicações, pela coleta dos primeiros adultos que visitam as culturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensáios foram realizados no cafezal do Instituto Biológico, localizado na parte posterior do prédio principal e na área ocupada pela variedade "Bourbon amarelo". Em observações preliminares localizamos uma área com plantas apresentando uma elevada porcentagem de frutos atacados, bem como intensa população movel (adultos).

A população de tripetídios na área experimental era constituida quasi que exclusivamente por *C. Capitata*. O número de *Anastrepha sp.* caçadas não atingiu a 10%.

O tipo de "caça moscas" utilizado foi um simples frasco com a abertura reduzida na parte superior, com capacidade para 100cc. Preferimos estes frascos aos classicos fechados na parte superior e envaginados com uma perfuração na parte inferior (Tipo Valenciano), em face da facilidade de limpeza e o pequeno peso dos mesmos. Outro fator importante na escolha foi a facilidade que os mesmos ofereciam ao transporte do laboratório ao campo experimental.

Nos frascos "caça moscas" foi sempre colocada a mesma quantidade de líquido para todas as experiências, ou seja 30cc.

Entre os produtos utilizados como iscas, alguns foram obtidos em nosso comercio sem características especiais. Outros ingredientes serão citados, com sua origem e outros detalhes peculiares, através do texto.

Os experimentos foram delineados segundo o método de blocos ao acaso. Cada parcela era constituida por uma arvore na qual se colocava um "caça moscas".

A estimativa dos resultados foi baseada na contagem de moscas capturadas em cada frasco.

1.ª SÉRIE DE EXPERIÊNCIAS

Ensáio A — Inicialmente procuramos realizar testes com formulas indicadas pela literatura (4) (2) (1) como possuidoras de algum poder atrativo para as "moscas das frutas". Essas formulas são preparadas a base de caseina, farelos, farinha de trigo, sofrendo préviamente uma fermentação.

Incluimos ainda nesse teste preliminar a isca contendo rapadura a 10% em agua, pois a mesma vinha sendo utilizada com grandes resultados em pomares citricos da zona de Bebedouro.

Resultados — Essas substâncias colocadas em frascos "caça moscas", nos indicaram segundo o resumo contido na tabela I, ser a rapadura a 10% significantemente superior às demais formulas. Esse ensáio preliminar assim nos orientou quanto a uma substância padrão inicial para comparação com outros atrativos.

TABELA I

Respostas da *Ceratitis capitata* à várias fórmulas atrativas

Fórmula testada	N.º de môscas capturadas em 10 repetições durante 48 h.										Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
A	2	1	2	6	0	3	3	1	0	8	26	1,62
B	22	15	13	12	23	13	20	4	14	12	148	3,83
C	13	19	10	13	8	6	15	8	6	10	113	3,37
D	25	14	8	17	10	12	6	11	7	12	122	3,49
E	26	12	25	28	18	32	18	25	19	28	231	4,81
Dif. significat. no nível fiducial											1%	0,84
											5%	0,62

A — 1 quilo de açúcar cristal
50 gr. de caseína
10 litros de água

B — 700 gr. de farelo
10 litros de água

C — 1 quilo de açúcar cristal
400 gr. de farinha de trigo
10 litros de água

D — 1 quilo de açúcar cristal
400 gr. de raspa de mandioca
10 litros de água

E — 1 quilo de rapadura
10 litros de água

Ensáio B — No segundo grupo de ensáios foi incluida a rapadura, ainda que em dosagem menor 5%, em competição inicial com cinco outros compostos, em igual concentração.

Resultados — A tabela II nos mostra as leituras finais num período de 48 horas. Verifica-se que a rapadura a 5% continuou demonstrando ser um atrativo superior mesmo em confronto com a proteina hidrolizada M. R. T. a qual atingiu o segundo lugar.

TABELA II

Respostas da *Ceratitis capitata* à várias substâncias atrativas

Material testado	N.º de môscas capturadas em 10 repetições durante 48 h.										Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
Sacarose 5%	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0,81
Glicose 5%	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,76
Levulose 5%	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8	0,82
Prot. Hidr. 5%	2	2	1	0	2	2	6	6	11	2	34	1,83
Fosf. Amonio 5%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,71
Rapadura 5%	0	4	2	3	5	8	7	5	7	7	48	2,20
Dif. significat. no nível fiducial											1%	0,23
											5%	0,18

De acôrdo com os resultados da tabela II, foram assim eliminados definitivamente a sacarose, glicose, levulóse e fosfato de amonio.

2.ª SÉRIE DE EXPERIÊNCIAS

Ensáio A — Iniciando a segunda série experimental incluimos 4 diferentes atrativos: rapadura, melaço, açucar mascavo e proteina hidrolizada M. R. T., em concentrações variáveis e incluimos a mistura de proteina hidrolizada a 5% com rapadura a 5%.

Resultados — A tabela III vem nos mostrar que entre todos os atraentes usados destacou-se significantemente o açucar mascavo a 10%, sendo mesmo superior à rapadura (5 e 10%).

TABELA III

Respostas da *Ceratitis capitata* à várias iscas contendo substâncias açucaradas e Proteina hidrolizada

Material testado	N.º de môscas capturadas em 10 repetições durante 48 h.										Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
Rapadura 5%	3	2	3	1	8	7	5	4	10	6	49	2,24
Rapadura 10%	3	2	1	1	4	5	6	8	13	3	46	2,13
Melaço 10%	6	2	3	2	4	4	8	6	19	1	55	2,28
Açúcar masc. 10% ...	5	6	3	6	9	11	7	8	16	12	83	2,89
Proteina hidr. (*) 5%	0	2	1	1	0	2	4	4	6	0	20	1,45
Proteina hidr. (*) 5% + rapadura 5%...	7	6	8	9	2	6	6	8	3	7	62	2,54
Dif. signif. no nível fiducial											1%	0,22
											5%	0,17

(*) Proteína de levedo parcialmente hidrolizada M R T (Marvin R. Thompson Co.)

A adição de proteina hidrolizada M. R. T. à rapadura melhorou o seu poder de atração, sendo superior aos niveis apresentados por essas substâncias quando em separado. Entretanto, o açúcar mascavo a 10% superou significantemente os demais atrativos, ou sejam, melaço, rapadura, proteina hidrolizada (M. R. T.) só ou em combinação com rapadura.

Ensáio B — Insistimos ainda quanto ao emprego de proteina sob forma líquida, incluindo no ensáio, cujos resultados estão condensados na tabela IV, quatro típos diferentes de proteinas hidrolizadas, de origem diversas, especificadas nessa tabela, em competição com o açúcar mascavo a 5% que até esse momento se evidenciou como o melhor atraente.

Resultados — De acôrdo com os dados da tabela IV, verifica-se que não houve diferenças significativas entre as quatro diferentes proteinas, entretanto, mais uma vez o poder de atração do açucar mascavo sobrepujou de modo altamente significativo aquelas substâncias de origem proteica.

TABELA IV

Respostas da *Ceratitis capitata* à várias iscas atrativas à base de proteinas hidrolizadas e de açúcar mascavo

Material testado	Concentração	N.º de môscas capturadas em 10 repetições durante 48 h.										Total	Média
Açúcar mascavo	5%	29	28	36	10	29	9	6	9	7	11	174	17,4
Proteína hidrol. * ..	5%	4	2	5	4	2	1	3	1	2	1	25	2,5
Proteína hidrol. ** ..	5%	8	12	8	9	6	3	9	5	2	4	66	6,6
Proteína hidrol. *** .	5%	3	11	14	3	6	2	4	6	4	6	59	5,9
Proteína hidrol. ****	5%	10	6	12	5	13	6	1	2	7	6	68	6,8

Dif. significat. no nível fiducial { 1% 5,96 ; 5% 4,44

* Proteína parcialmente hidrolizada (malte)
** Proteína hidrolizada M. R. T.
*** Proteína de peixe parcialmente hidrolizada
**** Proteína de peixe totalmente hidrolizada

Ensáio C — Como já haviamos feito com a rapadura (tabela III) procuramos num outro ensáio testar o efeito atrativo do açúcar mascavo e do melaço quando só ou em mistura com a proteina hidrolizada M. R. T., para verificarmos se em conjunto haveria um acrescimo no nível de atração dessas substâncias.

Resultados — Na tabela V estão condensados os dados obtidos. Assim eles nos indicam que a proteina hidrolizada M. R. T., não melhorou significantemente o poder de atração, quer do melaço, quer do açucar mascavo. Podemos ainda verificar que sob forma líquida o açúcar mascavo confirmou mais uma vez a sua superior qualidade como atraente à *Ceratitis capitata*.

TABELA V

Respostas da *Ceratitis capitata* à vários atrativos açucarados só ou em combinação com proteína hidrolizada

Fórmulas testadas *	N.º de môscas capturadas em 16 repetições durante o período de 96 h.																Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
A ...	34	8	5	2	27	29	11	5	6	6	3	2	16	22	3	15	194	3,26
B ...	3	1	2	0	4	0	1	1	2	1	0	2	3	6	3	0	29	1,42
C ...	3	2	2	1	2	6	4	2	6	5	3	4	4	5	3	10	62	2,03
D ...	1	0	1	4	12	5	7	0	4	0	3	6	4	0	5	4	56	1,81

Dif. signif. no nível fiducial ..... { 1% 0,82 / 5% 0,61

* A — Açúcar mascavo 10%
B — Melaço 10%
C — Açúcar mascavo 5% + proteína 5% M. R. T.
D — Melaço 5% + proteína 5% M. R. T.

3.ª SÉRIE DE EXPERIÊNCIAS

De posse dos conhecimentos basicos que conseguimos nesses primeiros testes, que nos mostraram o elevado poder atrativo do açúcar mascavo e considerando também o seu baixo custo que permite a sua aplicação para fins agrícolas, iniciamos nessa altura, os testes visando a determinação da dosagem mínima eficiente e o melhoramento e prolongação do seu poder atrativo.

Ensáio A — Primeiramente procuramos conhecer o comportamento das soluções de açúcar mascavo em diferentes concentrações, com o objetivo de utilizar a dosagem mínima eficiente.

Resultados — Na tabela VI estão resumidos esses dados, obtidos com 12 repetições e num período de 72 hs. de observação. Esses resultados assim nos indicam que as concentrações que alcançam melhor índice de atração estão localizadas entre 5 e 7,5%, caindo para as dosagens mais ou menos elevadas.

TABELA VI

Respostas de *Ceratitis capitata* a atração de várias concentrações do açúcar mascavo

Material testado	N.º de môscas capturadas em 12 repetições durante 72 h.												Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
Açúcar mascavo 2,5%	0	5	3	3	3	1	0	1	0	3	2	5	26	1,52
Açúcar mascavo 5,0%	39	2	4	3	7	24	14	9	20	25	32	6	185	3,68
Açúcar mascavo 7,5%	11	7	36	26	21	30	0	12	18	5	3	5	174	3,52
Açúcar mascavo 10,0%	10	3	6	7	27	5	11	13	7	1	20	13	123	3,09

Dif. significat. no nível fiducial { 1% 1,68 / 5% 1,24

Ensáio B — Num ensáio seguinte, e já nos utilizando de uma dosagem eficiente procuramos estudar a ação de preservativos sôbre o poder de atração do açúcar mascavo. Utilizamos nesse experimento o ácido bórico a 3,5%, propionatos de sódio e de calcio a 1%. A adição dessas substâncias inibidoras às soluções de açúcar mascavo teve a finalidade de evitar fermentações que pudessem alterar o seu poder de atração, ao mesmo tempo atender sugestões de diversos autores que recomendavam o emprego de ácido bórico nas formulas atrativas.

Resultados — Verifica-se pela tabela VII que no período de 48 horas todos os preservativos provocam uma leve melhoria no poder de atração do açúcar mascavo, porém, após 96 horas há uma modificação nesse aspecto isto é, constata-se uma quéda no seu poder atrativo. A conclusão a que podemos chegar a respeito — no período de 96 hs. — é que a inclusão dessas substâncias ao açúcar mascavo, com exceção do ácido bórico que é significantemente prejudicial, não alteram de muito o seu nível de atração, porém se torna desnecessário o seu uso, pois sempre acabam provocando leve baixa de eficiência.

TABELA VII

Respostas da *Ceratitis capitata* a atração de vários preservativos adicionados ao açúcar mascavo

Material testado (*)	N.º de môscas capturadas em 8 repetições			
	Após 48 h.	Média $\sqrt{X+0,5}$	Após 96 h.	Média $\sqrt{X+0,5}$
Açú. masc. + ácido bórico 3,5%	29	1,84	38	2,10
Açú. masc. + propion. de Ca 1%	21	1,73	88	3,27
Açú. masc. + propion. de Na. 1%	38	2,10	115	3,67
Açúcar mascavo	19	1,56	131	3,94
Dif. signif. no nível fiducial	1% 1,16 5% 0,86		1% 1,41 5% 1,04	

(*) Açucar mascavo a 7%

Ensáio C — Depois da realização do ensáio precedente, tivemos a oportunidade de observar que a atração se achava em grande parte ligada a fermentação natural das soluções de açúcar mascavo.

Chegamos a essa conclusão por havermos observado muitas vezes, que após alguns dias da distribuição dos frascos no campo, o poder de atração do açúcar mascavo, sofria uma ativação, procuramos então desenvolver a atual série de experiências, empregando soluções de açúcar submetidas préviamente à fermentação por período mais ou menos longo.

Resultados — A tabela VIII, contem os dados obtidos com soluções de açúcar mascavo a 5% preparadas na hora e com as que foram sujeitas a uma prévia fermentação no tempo variável de 2 a 8 dias. Podemos constatar que até o 4.º dia vai-se obtendo uma subida nitida na eficiência do atraente, daí por diante, percebe-se uma não menos evidente queda no poder atrativo das soluções, submetidas a tempo mais prolongado de fermentação.

TABELA VII

Respostas da *Ceratitis capitata* à atração de diversos estágios de fermentação do açúcar mascavo

Material		N.º de môscas capturadas em 15 repetições após 48 horas															Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
Atrativo	Dias de ferment.																	
Açúcar mascavo 5%	0	3	3	4	0	4	5	5	0	1	3	5	1	0	2	1	37	1,60
	2	2	2	2	4	3	7	2	2	5	7	3	2	1	3	9	54	1,95
	4	2	1	8	4	2	2	2	6	7	3	3	4	9	6	3	62	2,07
	6	3	0	0	5	1	6	0	1	4	1	1	3	4	3	3	35	1,57
	8	1	0	1	1	0	0	5	0	1	3	0	2	2	2	1	19	1,24
																	Dif. signif. no nível fiducial	1% 0,51
																		5% 0,38

Ensáio D — Verificado no teste anterior uma correlação entre o poder atrativo e um certo gráu de fermentação, procuramos incluir às soluções de açucar mascavo um fermento (Fleischmann), pois é conhecido que muitos tipos de leveduras provocam acentuado aumento no poder atrativo de muitas substâncias.

Resultados — A tabela IX contem os dados relativos a inclusão do fermento onde podemos verificar a falta completa de atração desse produto para a mosca do mediterrâneo, quando usado só. A sua inclusão ao açúcar mascavo, quer no início ou no fim das observações (48-96 hs.) sempre provocou também uma baixa significativa de eficiência, não sendo assim indicado o seu emprego.

TABELA IX

Respostas da *Ceratitis capitata* à atração do açúcar mascavo quando adicionado um fermento

Tratamentos	N.º de môscas capturadas em 8 repetições			Média $\sqrt{X+0,5}$ da 3.ª observ.
	Após 48 h.	Após 72 h.	Após 96 h.	
Açúcar mascavo 5%	53	116	210	5,03
Açúc. masc. 5% + fermento 1% ..	39	56	68	2,88
Açúc. masc. 5% + fermento 0,5%	25	33	44	2,37
Fermento 1%	0	0	0	0,71
Dif. signif. no nível fiducial			1%	1,02
			5%	0,75

4.ª SÉRIE DE EXPERIÊNCIAS

Ensáio A — Com o fim de melhorar o poder de captura dos frascos "caça moscas", pensamos incluir ao açúcar mascavo e proteina hidrolizada, substâncias inseticidas, que provocando mais rapidamente a morte das "moscas das frutas" não permitiriam fugas, embora estas sejam tanto quanto pudemos observar em pequena porcentagem.

Resultados — A tabela X reune esses resultados, onde verificamos que a inclusão de inseticidas sempre provoca quéda significante na porcentagem de captura das moscas, seja o atrativo açúcar mascavo ou proteina hidrolizada. A tabela X ainda nos mostra, que sob forma líquida, dos dois inseticidas empregados (Dieldrin e Malathion-pós molháveis) o Dieldrin é o que apresenta menor poder de repelência, quer misturado ao açúcar mascavo ou proteina.

Ensáio B — Pelo ensáio anterior verificamos a repelência relativamente alta dos inseticidas sôbre a porcentagem de captura de moscas. Sabendo que os pós molháveis quasi sempre contem uma certa dosagem de detergentes (Triton X 100) procuramos determinar em novos testes, qual a importância dessa substância sôbre aquela repelência apresentada pelos inseticidas.

Achamos ainda interessante a inclusão de um detergente às iscas sob forma líquida, a fim de constatar até que ponto ele poderia influir sôbre o meio, quebrando a tensão superficial e provocando assim mais rápida e maior retenção das moscas.

Como atrativos usamos o açúcar mascavo, já determinado por nós como a melhor das substâncias testadas e a sacaróse, cuja ação

atraente foi praticamente nula, a fim de verificar até que ponto poderia o detergente melhorar ou prejudicar as suas atividades.

TABELA X

Respostas da *Ceratitis capitata* à atração do açúcar mascavo quando em mistura com inseticidas

Tratamentos	N.º de môscas capturadas em 12 repetições durante 96 h.												Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
A	9	18	26	20	8	6	11	24	36	10	17	24	219	4,21
B	5	0	2	8	4	6	12	17	14	1	6	2	77	2,30
C	2	1	1	2	3	4	2	3	7	2	10	4	41	1,89
D	5	10	7	4	0	9	4	3	8	8	6	9	73	2,47
E	1	6	11	0	0	3	0	3	2	3	4	2	35	1,68
F	3	1	2	1	2	2	0	1	6	0	0	2	20	1,37
Dif. significat. no nível fiducial													1%	0,94
													5%	0,70

A — Açúcar mascavo 5%
B — Açuc. Masc. 5% + Dieldrin 0,1% p. at.
C — Açuc. Masc. 5% + Malathion 0,1% p. at.
D — Proteína hidrolizada 5% (M. R. T.)
E — Prot. hidr. 5% + Dieldrin 0,1% p. at.
F — Prot. hidr. 5% + Malathion 0,1% p. at.

Resultados — A tabela XI, apresenta resumidamente esses resultados, onde verifica-se a nítida e significante baixa do nível de atração do açúcar mascavo quando em mistura com o detergente e a inalterável atividade da sacarose quando só ou em mistura com aquele produto.

TABELA XI

Respostas da *Ceratitis capitata* à atração do açúcar mascavo, adicionado de um detergente

Tratamentos (*)	N.º de môscas capturadas em 16 repetições durante o período de 48 hs.																Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
A	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	6	0,86
B	95	5	6	20	16	9	21	9	2	10	45	18	11	9	20	13	309	4,03
C	0	0	0	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5	0,84
D	1	4	0	3	6	9	5	1	9	13	10	4	2	1	2	1	71	2,05
Dif. signif. no nível fiducial																	1%	1,02
																	5%	0,61

* A — Sacarose 5%
B — Açúcar mascavo 5%
C — Sacarose 5% + detergente 0,5%
D — Açúc. masc. 5% + detergente 0,5%

DISCUSSÃO

SHEPARD (6) cita que vários pesquizadores trabalhando com olfatometros, selecionaram atrativos, que quando submetidos as condições de campo não apresentavam a mesma resposta da alcançada no laboratório. O mesmo autor considera fundamental os testes realizados em campo para se obter uma margem elevada de segurança.

Verificamos através dos relatos dos ensáios, que o método empregado permite: selecionar uma determinada substância atrativa e com certo rigor a melhora eventual de seu poder de atração.

A escolha de um cafezal para os experimentos residiu principalmente no fáto de ser essa cultura um grande viveiro de *Ceratitis capitata*. Outra característica importante do cafezal é o espaçamento reduzido entre as arvores, o qual permite aos "caça moscas" colocados individualmente em cada arvore, com diferentes substancias, competirem na sua atração. Acresce notar que devido ao clima todo peculiar da Capital, conseguimos realizar os nossos testes desde junho de 1956 até fins de dezembro do mesmo ano, pois dentro desse tempo algumas floradas se sucederam, sendo assim renovada a produção do cafezal, e como consequência, as moscas foram sempre encontrando frutos maduros (cerejas) onde prosseguir com novas gerações.

Em face das floradas sucessivas apresentadas pelo cafezal, tivemos uma produção constante de adultos originados das pupas existentes no sólo, ao redor dos cafeeiros espaçadamente atacados. Isto nos garantiu uma população mais ou menos homogenea em toda a área experimental. Essas circunstância nos pareceu imprescindível para as experiências em aprêço, devido as informações colhidas por nós em estudos que estamos realizando sôbre a ecologia da *Ceratitis capitata* e *Anastrepha* sp. e que nos mostram que os adultos presentes nas culturas de pessegos e citros têm sua origem principalmente de pupas provenientes de sólo onde vegetam plantas frutiferas que circundam os pomares, plantas essas cuja frutificação se antecipara de alguns meses (Mirtaceas, rosaceas, etc.). Conclue-se daí que os pomares sujeitos as incursões apresentam uma grande heterogeneidade na intensidade da população; isto é, poucos metros distantes da área limitrofe se observa uma grande redução no número de tripetidios quando comparado com a população existente na borda da cultura.

Segundo trabalhos de STEINER (7) e outros, as proteinas hidrolizadas quando utilizadas como iscas atrativas nas pulverizações, apresentam os melhores índices de atração aos tripetidios. Trabalhos experimentais, ao lado de aplicações em massa confirmaram plenamente essa atração. No entanto, pelo exame das tabelas II e III verificamos que a atração de proteína hidrolizada é inferior ao da rapadura

e açucar mascavo quando utilizado em frasco, sob a forma de solução. Aliás, STEINER (7) já verificou que a proteina hidrolizada sob forma líquida em frasco não se apresentava como um atraente de altas possibilidades. Ela se manifesta com alto poder atrativo nas pulverizações, isto é, sob forma de isca sêca.

Nos ensáios em que se utilizou açúcar mascavo e proteina hidrolizada M. R. T., pudemos constatar uma seleção interessante quanto ao atrativo, pelos dipteros *Lonchaea pendula* BEZZI (*) e *Lonchaea chalybea* WIED. (**). A primeira espécie visitava somente os frascos que continham proteina e a segunda sempre foi coletado em açúcar mascavo.

Nossas tentativas em melhorar o poder atrativo do açúcar mascavo acrescentando nas soluções, ativadores (Fermento Fleischmann) e inibidores (Propionatos e Acido bórico) de fermentação não lograram exito.

Acreditamos, em face de nossos resultados, que nas soluções de açúcar mascavo fermentadas naturalmente, desenvolve-se uma flóra microbiana peculiar, de cuja atividade resulta essa atração ótima à *Ceratitis capitata.*

SCREENING TESTS OF CHEMICALS FOR LIQUID BAIT IN TRAPS AS ATTRAHENTS TO "MEDITERRANEAN FRUIT FLY" — *CERATITIS CAPITATA (WIED.)*

Abstract

A series of trials to find out the efficacy of several substances as liquid baits to attract the "mediterranean fruit fly" (Ceratitis capitata Wied.) were run in the experimental field of coffee crop located in the Instituto Biológico.

Small glass flasks containing 30cc of different solutions were used as trap. The best results were obtained with a brown sugar cane solution 5-7,5%. Attempts to improve the efficiency of that formula by adding activators and inhibitors of the natural fermentation were not successful.

It was verified that the detergents, as Triton X 100, used normally in wettable powder formulations of organic insecticides reduce the effectiveness of the bait.

Since arround S. Paulo city (Brazil) the production of coffee berry last during several months of the year, maintaining a high level of adult population, it was possible to make a large numbers of trials.

(*) Identificação de E. Navajas, a quem agradecemos.

(**) Identificação de Messias Carrera por gentileza de E. Navajas, com os nossos agradecimentos.

According STEINER *results (7) the protein hydrolysates do not function well when dissolved in water and used as liquid bait in traps what was confirmed in our experiments. However these baits showed a high efficiency as attrahents to the dipterous Lonchaea pendula Bezzi a probable secondary pest of some fruits.*

BIBLIOGRAFIA

1) BODENHEIMER, F. S. — 1951 — *Citrus Entomology*, 663 pp.

2) GOMES, J. G. — 1937 — Resumo de experiências com frascos caça moscas no combate às "moscas das frutas". *Rev. da Soc. Brasileira de Agronomia, vol.* 1 — n.º 2 — 118-124.

3) GONÇALVES, C. R. — 1938 — As moscas das frutas e seu combate. *Ministério da Agricultura. D. N. P. V.* — Serviço de Defesa Sanitaria Vegetal — *Publicação n.º* 12 — 48 pp.

4) HANNA, H. D. — 1939 — Studies in the mediterraneam fruit fly (*Ceratitis capitata* Wied.) *Bull. Soc. Fouad, I. Ent.* 22: 39-59.

5) PUZZI, D. e A. ORLANDO — 1957 — Ensáios de combate às "moscas das frutas" (*Ceratitis capitata* Wied. e *Anastrepha* sp.) por meio de pulverizações de iscas envenenadas. "*O Biológico*", *vol. XXIII* N.º 2 pp. 21-25.

6) SHEPARD, H. H. — 1942 — The chemistry and toxicology of insecticides pp. 352-360.

7) STEINER, L. F. — 1955 — Bait sprays for fruit fly control. *Agricultural Chemicals.* November.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Oswaldo Giannotti, Chefe da Seção de Inseticidas, os nossos agradecimentos pelas sugestões apresentadas no decorrer do trabalho.

Somos gratos ao Dr. Julio Franco do Amaral, chefe da Seção de Bacteriologia Vegetal, pelos cuidados dispensados ao cafezal por nós utilizado e que se encontra sob sua administração.

Ao Dr. Alexis Matarrita Acuña, engenheiro-agrônomo do Ministério da Agricultura de Costa Rica, óra como estagiário no Instituto Biológico, agradecemos pelo auxílio na análise estatística dos dados.

———o———

Vol. 24 — Artigo 11 Novembro de 1957

ESTUDOS DE SUBSTÂNCIAS ATRATIVAS À "MOSCA DO MEDITERRÂNEO" - *CERATITIS CAPITATA* (Wied.) NA FORMA DE ISCAS SÊCAS, COM O EMPRÊGO DE UMA NOVA TÉCNICA

POR

D. Puzzi e A. Orlando

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 11 tabelas no texto e as estampas 4 e 5

INTRODUÇÃO

Investigações recentes no Hawaii, visando a criação em massa das "moscas das frutas" em cativeiro, demonstraram que certas proteinas hidrolizadas, eram imprescindíveis na diéta de diversos tripetídios para que eles alcançassem uma alta fecundidade. Moscas alimentadas apenas com açúcar, sucos de frutos e água, só atingiam à maturidade sexual depois de 3 semanas, pondo um número muito reduzido de ovos. Adicionando-se, porem, proteinas hidrolizadas na diéta, a maturidade sexual era atingida em 8 a 9 dias, com elevada produção de ovos.

Esse comportamento dos tripetídios sugeriu o emprêgo de diversas proteinas hidrolizadas como atraentes, pulverizando-as sôbre a folhagem. Desde o início foi verificado que, realmente, essas substâncias possuiam um grande poder atrativo para as principais "moscas das frutas" do Hawaii.

Experiências ulteriores mostraram que as proteinas hidrolizadas que revelaram um maior poder de atração nas fórmulas de iscas pulverizadas, são justamente as que garantem um maior índice de fecundidade, quando administradas nas diétas.

Em face da importância de que se reveste a atração das iscas, quando aplicadas em pulverizações envenenadas, no combate às "moscas das frutas" iniciamos diversos ensáios, a fim de verificar qual a substância economicamente utilizavel em nossas condições, em base comercial, em vista do alto preço das proteínas hidrolizadas, pois as mesmas, no momento, não se encontram em nossa indústria, ficando, assim, na dependência de uma importação onerosa.

Em ensáios preliminares, verificamos que certas substâncias empregadas sob forma líquida apresentavam uma atração às "mos-

cas das frutas" bem diversa daquela apresentada, quando aplicadas sob fórma de iscas sêcas. O açúcar mascavo, por exemplo, em trabalhos que realizamos anteriormente (2) revelou um índice de atração superior ao de certas proteínas hidrolizadas, quando ambas as substâncias eram utilizadas sob forma líquida. Quando aplicadas sob a forma de iscas sêcas, no entretanto, o poder de atração do açúcar mascavo foi muito inferior ao da proteína hidrolizada. Esses ultimos ensáios foram realizados por meio de processos pouco práticos e em pequena escala.

Como o nosso maior interesse era o de realizar uma seleção de substâncias que se prestassem como atraentes nas pulverizações, onde elas se comportariam como iscas sêcas, em face da rápida evaporação do solvente logo após a aplicação, procuramos desenvolver um método de campo que se ajustasse à essa finalidade.

Nêsse sentido, alguns autores têm estudado processos de campo, com resultados satisfatórios, mas que são entretanto, de aplicação restrita e laboriosa.

Por essa razão, procuramos desenvolver uma nova técnica de aplicação mais ampla e que fosse de execução mais rápida.

MATERIAL E MÉTODO

As experiências foram realizadas em cultura de café — "Bourbon amarelo" — localizada no campo experimental do Instituto Biológico, na Capital. Esse cafezal apresenta apreciável infestação de *Ceratitis* durante um longo período do ano em virtude da presença quasi constante de frutos maduros.

As iscas, sob fórma sêca, foram colocadas em caixas de Petri de 10 cm de diâmetro, nas quais foram praticadas 3 aberturas invaginadas com o diâmetro de 8 mm, uma na placa inferior e duas na placa superior. Sôbre a superfície interna das placas aplicou-se a substância atrativa em solução, na forma de pequenas gotas, por meio de uma pipeta ou através de uma pulverização. Uma vez evaporado o solvente das gotículas (3 a 6 hs.), ficava sôbre a superfície da placa um resíduo semelhante ao das pulverizações sôbre as fôlhas. As placas, depois de fechadas, eram invertidas e suspensas por fios de arame, funcionando assim como os "caça moscas" comuns de frascos. Quando penduradas entre os ramos de café, nos permitia, através do número de moscas atraídas e capturadas, verificar qual a substância sob a forma sêca que se apresentava com maior atra-

ção à *Ceratitis*, em face da competição que se estabelece entre as diversas placas contendo as iscas. As fotografias nos dão uma idéia bem precisa da técnica. (Estampas 4 e 5).

A quantidade de líquido foi sempre de 2 cc por caixa de Petri (1cc em cada face) nas concentrações especificadas nas tabelas correspondentes.

Em todos os testes de atrativos sempre foi empregado o Dieldrin pó molhável, na base de 0,1% de princípio ativo, a fim de matar as moscas que penetrassem nas placas, evitando assim eventuais fugas. Esse inseticida foi escolhido, por se revelar em experimentos anteriores (1) (3) com pequena influência sôbre o poder de atração de algumas substâncias.

RESULTADOS

Com o emprêgo da técnica descrita realizamos uma série de ensáios que passamos a descrever:

1.º Ensáio — A tabela I contem os dados referentes ao poder atrativo de 3 diferentes substâncias: sacarose, açúcar mascavo e proteína hidrolizada de fermento (N. B. C.). Verifica-se, por esses dados, que essa proteína hidrolizada que foi uma das utilizadas por STEINER (5) no Hawaii, possui realmente um alto poder atrativo, quando usada sob a forma de isca sêca.

TABELA 1

Respostas da *Ceratitis* quanto à atração de três diferentes substâncias

Substâncias atrativas *	Moscas capturadas em 5 repetições					Total
Sacarose — 5%	0	0	0	0	0	0
Açúcar mascavo — 5%	0	0	0	0	0	0
Proteína hidrol. (**) 2,5%	31	33	18	18	31	131

* Adicionou-se Dieldrin a 0,1% de princ. ativo
** Yeast hydrolysate (Enzymatic) — Nutritional Biochemicals Corporation (N. B. C.) Cleveland — Ohio

2.º Ensáio — Nesta experiência incluimos uma nova proteína hidrolizada originária de farinha de peixe, em duas concentrações, em comparação com o açúcar mascavo, porem na dosagem de 10%.

TABELA 2

Resposta da *Ceratitis* à elevadas concentrações de proteina hidrolizada e açúcar mascavo

Substâncias atrativas *	Moscas capturadas em 5 repetições					Total	Média
Proteína hidrolizada — 5% (**)	10	7	8	9	18	52	10,4
Proteína hidrolizada 2,5% (**)	3	2	3	4	4	16	3,2
Açúcar mascavo — 10%	4	3	1	1	1	10	2,0
Dif. signif. no nível fiducial						1%	5,81
						5%	3,99

* Adicionou-se Dieldrin a 0,1% de princ. ativo

** Proteína hidrolizada originária de farinha de peixe manufaturada pela Citrobrasil S. A. - S. Paulo

Verifica-se, pela tabela II, que de fato o açúcar mascavo, mesmo na concentração elevada de 10%, é um atraente fraco quando empregado sob a forma de isca sêca. A proteína hidrolizada de peixe, quando usada a 5%, demonstrou um regular poder atrativo para a *Ceratitis*.

3.º Ensáio — Incluimos nesse ensáio o melaço de cana de açúcar, o qual contem proteínas e amino acidos, encontrando-se facilmente em nosso meio a baixo preço. O seu poder atrativo foi comparado com o açúcar mascavo.

TABELA 3

Resposta da *Ceratitis* ao melaço de cana e açúcar mascavo

Substâncias atrativas *	Moscas capturadas em 5 repetições					Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
Açúcar mascavo — 10%	0	0	0	2	1	3	1,08
Melaço — 5%	5	1	5	6	4	21	2,11
Melaço — 10%	7	7	2	4	2	22	2,15
Dif. signif. no nível fiducial						1%	0,28
						5%	0,19

* Adicionou-se Dieldrin a 0,1% de princ. ativo

A tabela III nos mostra que o melaço é significantemente superior ao açúcar mascavo, nas duas concentrações usadas, fato que não se verificou quando usados sob forma líquida (2).

4.º Ensáio — Uma vêz constatada, pelo ensáio 3, uma boa atividade do melaço, procuramos determinar aproximadamente, qual a sua concentração mínima eficiente, a fim de compara-lo nessa dosagem, com proteínas hidrolizadas.

TABELA 4

Determinação da dose minima eficiente de melaço, quanto ao poder atrativo para a *Ceratitis*

Substâncias atrativas *	Moscas capturadas em 5 repetições					Total	Média
Melaço — 2,5%	6	14	13	15	9	57	11,4
Melaço — 5,0%	11	18	21	8	7	65	13,0
Melaço — 10,0%	12	14	16	18	17	77	15,4
Dif. signif. no nível fiducial						1%	6,2
						5%	3,5

* Adicionou-se Dieldrin a 0,1% de princ. ativo

Pela tabela IV, verifica-se que a concentração mais conveniente é a de 5%, pois se revelou tão eficiente quanto a de 10%.

5.º Ensáio — Determinada uma concentração ótima para o melaço, procuramos compará-lo nessa concentração com a proteina hidrolizada, originaria de farinha de peixe, a qual já havia demonstrado possuir algum poder atrativo na dosagem de 5% (ensáio 2). Além disso, estudamos tambem o comportamento da proteína em mistura com o melaço.

A tabela V nos mostra não existir uma diferença significante entre os três tratamentos.

TABELA 5

Resposta da *Ceratitis* à diferentes formulas atrativas à base de proteína hidrolizada e melaço

Substâncias atrativas *	Moscas capturadas em 5 repetições					Total	Média
Melaço — 5%	14	6	6	9	4	39	7,8
Proteína hidrolizada — 5%	16	3	8	5	9	41	8,2
Melaço 5% + Prot. hidrol. (**) — 5%	15	11	9	4	11	50	10,0
Dif. signif. no nível fiducial						1%	6,03
						5%	4,15

* Adicionou-se Dieldrin a 0,1% de princ. ativo
** Proteína hidrolizada, originária de farinha de peixe

6.º Ensáio — Neste ensáio comparamos a eficiência do melaço a 5% com diferentes dosagens da proteína hidrolizada de fermento (NBC) que no 1.º ensáio demonstrou elevado índice de atração à *Ceratitis*. Visamos assim, determinar em que concentração, a proteína empregada no Hawaii seria comparável com a de melaço a 5%.

TABELA 6

1.º Ensáio para comparação do poder atrativo da proteína hidrolizada (N B C) em relação ao melaço a 5%

Substâncias atrativas *	Moscas capturadas em 5 repetições					Total	Média
Proteína hidrolizada ** — 0,5% .	10	11	9	12	6	48	9,6
Proteína hidrolizada ** — 1% ...	16	14	14	8	14	66	13,2
Melaço — 5%	4	6	7	4	2	23	4,6
Dif. signif. no nível fiducial						1%	5,16
						5%	3,67

* Adicionou-se Dieldrin a 0,1% de princ. ativo
** Proteína hidrolizada (N. B. C.)

TABELA 7

2.º Ensáio para comparação do poder atrativo da proteína hidrolizada (N B C) em relação ao Melaço a 5%

Substâncias atrativas *	Moscas capturadas em 5 repetições					Total	Média
Proteína hidrolizada ** — 0,25% .	10	37	17	6	9	79	15,8
Proteína hidrolizada ** — 0,10% .	4	1	2	10	2	19	3,8
Melaço — 5%	6	4	5	9	11	35	7,0
Dif. signif. no nível fiducial						1%	5,84
						5%	4,02

* Adicionou-se Dieldrin a 0,1% de princ. ativo
** Proteína hidrolizada (N. B. C.)

TABELA 8

3.º Ensáio para comparação do poder atrativo da proteína hidrolizada (N B C) em relação ao melaço 5%

Substâncias atrativas *	Moscas capturadas em 5 repetições					Total	Média $\sqrt{X+0,5}$
Proteína hidrolizada ** — 0,2% ...	13	12	6	13	9	53	3,30
Proteína hidrolizada ** — 0,1% ..	0	3	5	8	7	23	2,11
Melaço — 5%	16	16	9	5	6	52	3,22
Dif. signif. no nível fiducial						1%	0,86
						5%	0,12

* Adicionou-se Dieldrin a 0,1% de princ. ativo
** Proteína hidrolizada (N. B. C.)

As tabelas VI, VII e VIII que resumem os resultados obtidos, nos indicam que o poder atrativo do melaço é de fáto extremamente inferior ao da proteína hidrolizada de fermento (NBC), somente a ela se equiparando quando a diluição da proteína se aproxima de 0,2%.

Considerando-se que 0,75% é a concentração média indicada por STEINER (5) para proteínas do tipo acima citados, verifica-se que mesmo empregando um dos nossos melhores materiais disponíveis como atrativo (melaço) não alcançamos a eficiência obtida no Hawaii com o emprego daquelas substâncias. Mesmo que o baixo custo do melaço permitisse o uso de concentrações superiores a 5%, seria impossível alcançar um índice de atração comparável ao de certas proteínas hidrolizadas, pois que, segundo resultados obtidos (ensáio 4), a dosagem de 10% não foi mais eficiente que a de 5%.

7.º Ensáio — De acôrdo com os resultados obtidos nos ensáios 1, 2 e 3 do presente estudo, concluiu-se que o açúcar mascavo não possui um bom poder atrativo à *Ceratitis*, quando empregado sob a forma de isca sêca. Obtêm-e ótima atração quando usado em soluções nos frascos "caça-moscas" onde sempre se processa uma fermentação natural (2).

Neste ensáio procuramos comparar, sob a fórma de isca sêca, três fórmulas atrativas à "mosca do mediterraneo": a) solução de açúcar mascavo recem preparada; b) solução de açúcar mascavo previamente fermentada e c) solução de melaço.

TABELA 9

Resposta da *Ceratitis* ao açúcar mascavo quando fermentado ou não, em comparação com o melaço de cana

Substâncias atrativas *	Moscas capturadas em 5 repetições					Total	Média $\sqrt{X + 0,5}$
Açúcar mascavo — 10%	1	0	3	1	0	5	1,15
Açúcar mascavo — 10% (fermentado) **	1	5	10	3	2	21	2,03
Melaço — 10%	2	8	9	3	0	23	2,05
Dif. signif. no nível fiducial						1%	1,06
						5%	0,72

* Adicionou-se Dieldrin a 0,1% de princ. ativo
** O açúcar mascavo ficou em fermentação durante 7 dias

Na tabela IX estão condensados os resultados obtidos. Verifica-se que a solução de açúcar mascavo fermentado de modo natural por 7 dias, se apresentou com melhor poder atrativo em relação

a não fermentada chegando a se igualar ao melaço, o qual, como vimos, foi sempre superior ao açúcar mascavo.

4.º *Ensaio* — Diversas experiências têm revelado certa interferência dos inseticidas no poder atrativo das iscas.

Neste ensaio procuramos estudar qual seria a influência dos inseticidas sôbre o poder de atração da isca quando se aplicava a ambos em apôsto. Comparamos primeiramente o Dieldrin aplicado na fórma de pó molhavel e na fórma de emulsão e em seguida o Dieldrin e Malathion, ambos na fórma de pó molhável. Como isca foi sempre empregado o melaço a 5%.

Na tabela X reunimos os dados relativos ao Dieldrin, onde verificou-se que é indiferente usa-lo sob a fórma de pó molhável ou emulsão, quanto ao seu efeito na atração aos adultos da *Ceratitis*.

TABELA 10

Efeito do Dieldrin quando empregado sob as formas de pó molhavel ou emulsão, sobre o poder atrativo do melaço

PORCENTAGENS TESTADAS	Moscas capturadas em 8 repetições								Total
Melaço — 5% — Dieldrin — 0,1% pó molhavel ...	1	15	9	6	4	8	7	6	52
Melaço — 5% — Dieldrin — 0,1% emulsão	6	14	4	4	2	6	7	12	54

TABELA 11

Efeito do Malathion ou Dieldrin sobre o poder atrativo do melaço

PORCENTAGENS TESTADAS	Moscas capturadas em 8 repetições								Total	Média
Melaço — 5% — Malathion * — 0,1% ...	7	10	16	11	7	3	5	4	63	7,7
Melaço — 5% — Dieldrin * — 0,1% ...	7	6	10	4	11	3	4	6	51	6,4

* 3ª repetição

Pela tabela XI observa-se quanto ao mesmo aspecto, ser indiferente o emprêgo do Dieldrin ou Malathion, pois não há grande disparidade no número de moscas atraídas, nas diferentes placas.

Como já foi exposto, esses resultados foram obtidos com o emprego do melaço. É provavel que com outras substâncias atrativas o comportamento dêsses inseticidas seja diferente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nestes últimos 5 anos STEINER (4) (5) tem conduzido uma série de experimentos, procurando melhorar as iscas utilizadas sôbre a fórma de pulverização. Os métodos utilizados em laboratório não alcançaram resultados satisfatórios com as principais espécies de tripetídios existentes no Hawaii.

A técnica de campo utilizada por STEINER com resultados satisfatórios foi a seguinte: Bandejas de 3 pés quadrados eram colocadas em um ponto da arvore onde pudessem ficar logo abaixo de ramos terminais que recebiam uma pulverização de 5 a 10 cm^3 da isca. Ajuntava-se à isca um inseticida fosforado o qual em virtude de sua ação rápida, principalmente quando ingerido, permitia a contagem dos insetos atraidos e mortos. O número de moscas apanhadas nas bandejas possibilitava avaliar e comparar os efeitos dos tratamentos. As moscas mortas que caiam fóra da bandeja era em pequeno número, não alterando apreciavelmente os resultados. Este método, segundo o autor, reflete perfeitamente o poder de atração dos produtos experimentados, porque os inseticidas quando aplicados isoladamente, causam a quéda de raras moscas, enquanto que as iscas envenenadas quando pulverizadas, atraem mais de um milhão de moscas por libra de proteína hidrolizada. A atração torna-se maior quando o depósito da proteína torna-se totalmente sêco.

Algumas tentativas de nos utilizarmos daquela técnica, não lograram exito. Acreditamos que um dos fatores que não nos permitiu empregar a técnica de STEINER foi o de nossas culturas não apresentaram, possivelmente, infestações tão intensas quanto às verificadas no Hawaii.

Além disso, tinhamos grande interesse em adicionar à substância atrativa um inseticida clorado (Dieldrin, Toxafeno) em vista dos resultados experimentais de campo por nós obtidos anteriormente (1) (3). Entretanto, com a técnica de STEINER, não se pode usar esses inseticidas, pois em virtude de sua ação lenta, um grande número de insétos intoxicados iria morrer fora da bandeja, escapando à contagem. Com as caixas de PETRI modificadas, as quais não permitem a fuga das moscas, desde que estas apresentem qualquer indicio de intoxicação, é possível testar a influência de qualquer inseticida sôbre a isca. Em nossas experiências, embóra tivessemos trabalhado com um inseticida clorado, não nos foi dada a oportunidade de verificar a fuga de nenhum exemplar, a despeito do "knock down" lento que o Dieldrin apresenta.

Os resultados obtidos por meio dessa técnica confirmam que as proteinas hidrolizadas, quando aplicadas sob a forma de pulveri-

zação, são realmente os produtos que alcançam o maior índice de atração aos tripetídios, conforme já havia sido verificado por STEINER. Eles nos permitiram tambem verificar que, entre os produtos economicamente disponíveis entre nós, o melaço de cana é o melhor atraente, fato que já está sendo confirmado na prática, em pulverizações realizadas em pomares de Citros.

STUDIES ON SOME ATTRACTING SUBSTANCES EMPLOYED AS DRY BAITS TO THE "MEDITERRANEAM FRUIT FLY" — *CERATITIS CAPITATA* (WIED.) — AND USING A NEW TECHNIC

Abstract

With the view of selecting various attracting substances to the "Mediterraneam fruit fly" — Ceratitis capitata (Wied.) as dry baits, the authors point out a new and simple field method that is quite satisfactory.

The new technic consists of using Petri dishes where three invaginated apertures were made (See photos) and in spraying or applying to the internal surfaces of the dishes with the aid of a pipette a mixture of an insecticide and the attracting substance being tested.

After the baits were dry the plates were hanged among the coffee trees boughs by wire. The number of adults that were attracted and captured allowed the verification of the substances that had more attracting power.

By employing the described technic one can the influence of any insecticide (inorganic, chlorinated or phosphorated) on the bait.

The results obtained by employing the modified Petri dishs attest that hydrolysed proteins are realy the substances that show the highest index of attraction when sprayed, concerning the trypetids, as STEINER *(4) (5) had already stated.*

By these results we were able to verify that among the substances obtainable in Brazil cane molasses are the best attracting matter, otherwise this statement has already been praticaly confirmed in Citrus plantations.

BIBLIOGRAFIA

1) PUZZI, D. e A. ORLANDO — 1957 — Ensáios de combate às "moscas das frutas" — *Ceratitis capitata* (Wied.) e *Anastrepha* sp. por meio de pulverizações de iscas envenenadas. *"O Biológico"* Vol. XXIII N.º 2 pp. 21-25.

2) PUZZI, D. e A. ORLANDO — 1957 — Ensáios para seleção de substâncias sob forma liquida, como atraentes para a "mosca do mediterraneo". *Ceratitis capitata* (Wied.) *Arq. Inst. Biológico.* Vol. 24: 137-149.

3) PUZZI, D. e ANDRADE A. C. e CAMARGO, J. C. — 1955 — Experiência de controle às moscas das frutas em 1955. *"O Biológico"*, XXI: 10: 185-188.

4) STEINER, L. F. — 1952 — Fruit Fly Control in Hawaii with Poison — Bait Sprays Containing Protein Hydrolysates. *Journal of Econ. Entomol. Vol. 45* N.º 5: 838-843.

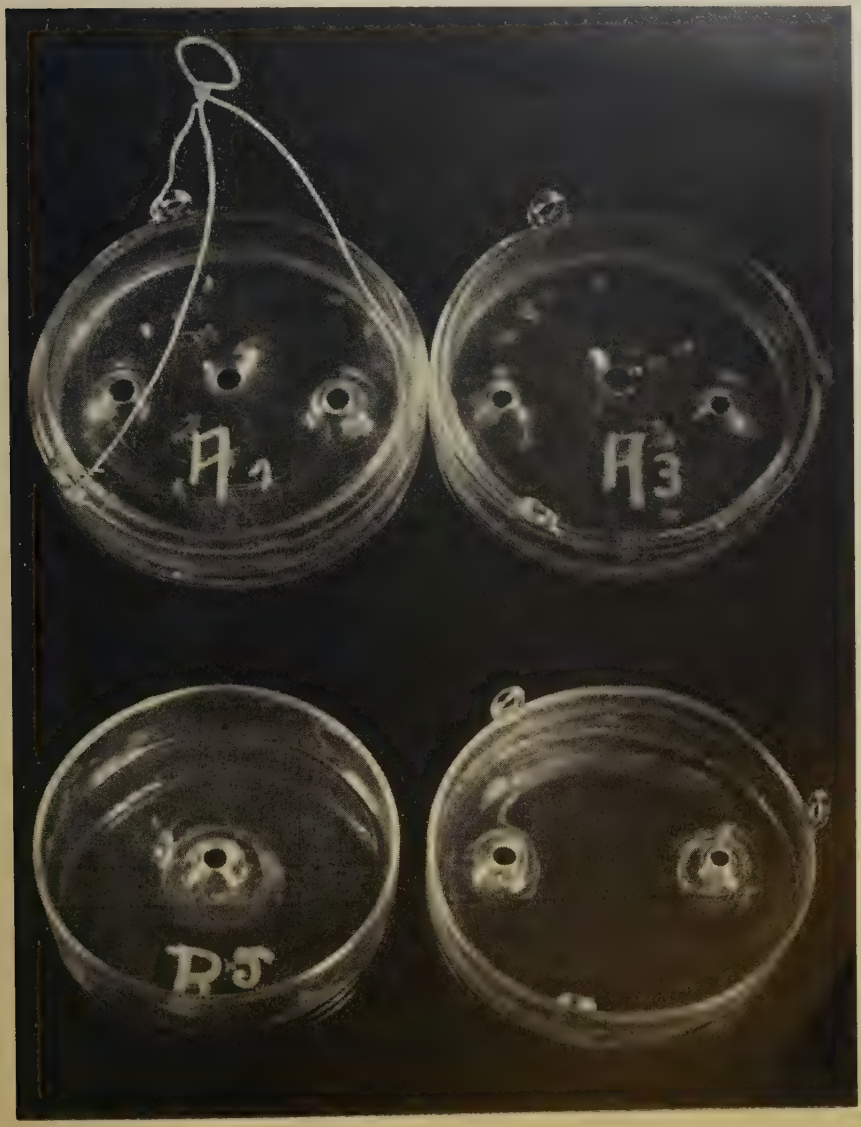
5) STEINER, L. F. — 1955 — Bait sprays for fruit fly control. Agricultural Chemicals. November.

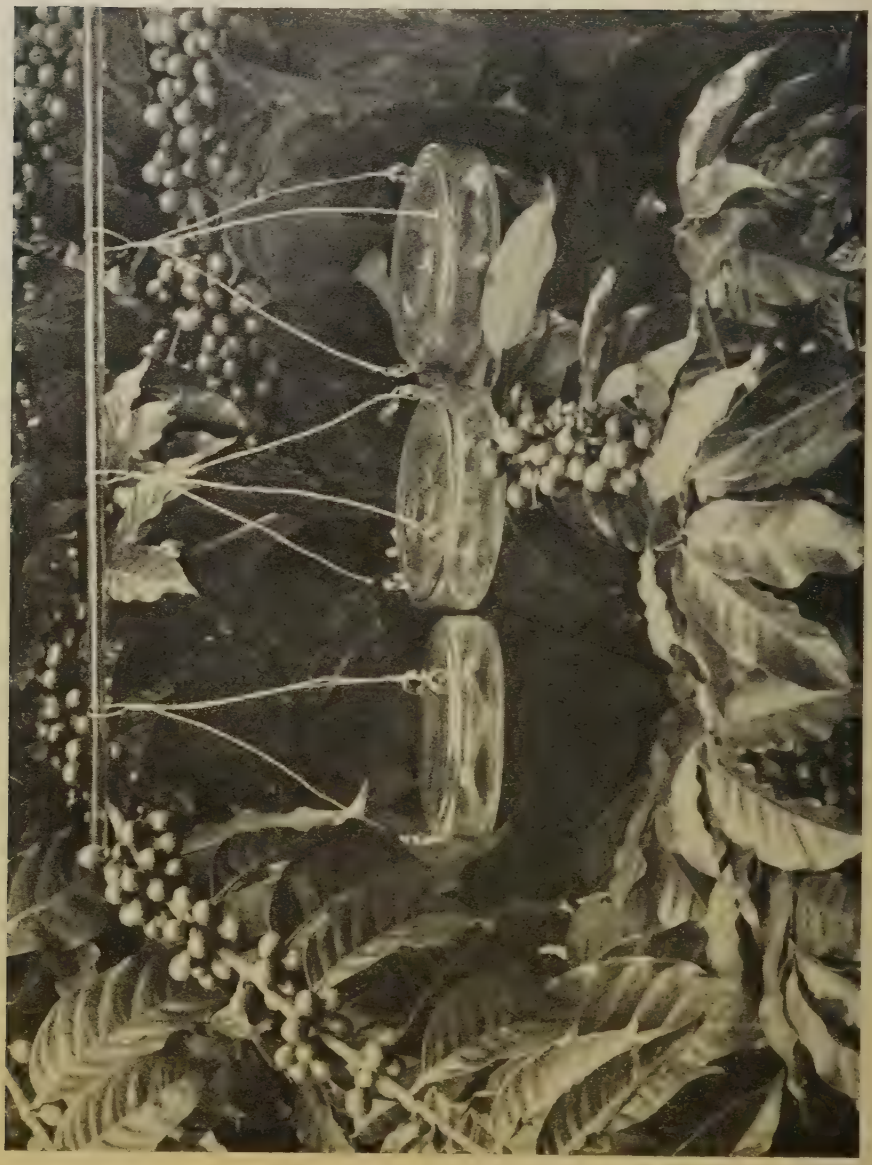
AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Augusto de Leon Rojas, Engenheiro Agrônomo do Ministério de Agricultura da Guatemala, óra como estagiário no Instituto Biológico, agradecemos pela colaboração nos experimentos.

Somos gratos ao Dr. Mario Meneghini, Chefe da Seção de Bioquimica Vegetal, pelas suas sugestões na elaboração do texto.

Os nossos agradecimentos ao Snr. Horacio Seraphim de Oliveira, tecnico em confecção de aparelhos de laboratório — Seção de Vidros deste Departamento, pela elaboração das placas utilizadas nas experiências.


A1
A3
RJ



Vol. 24 — Artigo 12 Novembro de 1957

TECIDO RENAL DE COBAIA CULTIVADO POR NOVA TÉCNICA E SUA SENSIBILIDADE AO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA

POR

M. P. de Castro e D. Mello

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Sob os auspicios do Conselho Nacional de Pesquisas

Com a estampa 6

INTRODUÇÃO

"O sistema ideal para o estudo da multiplicação dos vírus animais está indiscutivelmente em alguma forma de cultura de tecidos; o uso de tal método só proporcionará resultados comparáveis aos obtidos pelos pesquisadores em bacteriófago, até que duas condições de cultura sejam alcançadas: 1. o uso de suspensões ou lençóis de celulas susceptíveis nos quais o número de células expostas simultâneamente a uma determinada quantidade de vírus possa ser determinado com precisão; 2. o uso de um meio definido para a manutenção dessas células" (9).

Este sistema ideal de SANDERS foi, pelo menos em parte, alcançado pelos pesquisadores mais recentes que, baseados na verificação de ROUS e JONES (8), de que era possível preparar uma suspensão celular tratando-se uma cultura de tecidos por tripsina em concentração suficiente para causar a dissociação das células sem intoxicá-las, conseguiram desenvolver técnicas que permitiram obter suspensões de células isoladas ou em pequenos aglomerados, a partir de órgãos e tecidos, normais ou cancerosos, embrionários ou adultos (*1, 2, 4, 6, 7, 10*).

A cultura das células obtidas dessa maneira apresentava vantagem sôbre tôdas as outras técnicas, porque: torna possível preparar grande número de culturas com aproximadamente o mesmo número de células (*3, 5*); as células sedimentadas e aderidas à superfície do frasco de cultura se multiplicam formando um lençol contínuo, uniestratificado, que favorece a observação microscópica e permite a tôdas as células da cultura entrar em contacto simultâneo com a suspensão de vírus. Por isso, êsse processo, representado por muitas variantes, têm sido nos últimos anos, muito usado pelos virologistas, constituindo mesmo um dos seus mais acurados instrumentos de trabalho.

Com o intuito de cultivar o vírus da febre aftosa "in vitro", iniciámos uma série de experimentos. Êste trabalho representa a primeira etapa alcançada: o acêrto de uma técnica simples para a cultura de células renais de cobaia e a demonstração de que o emprêgo desta técnica e dessas células é compativel com o crescimento do vírus.

Desejamos agradecer a C. PEREIRA a leitura dos originais e sugestões; a M. SIQUEIRA pelos sôros imunes e amostras de vírus.

MATERIAL

Material celular proveniente de rins de cobaia recemnascida, extraídos depois de anestesia pelo eter e sangria a branco por decapitação. Meio de cultura para o tecido renal constituido de 40 por cento de sôro inativado, de carneiro ou de cavalo, 10 por cento de extrato embrionário em solução salina de HANKS. Meio de manutenção para inoculação de vírus constituido de 10 por cento de sôro inativado de cobaia, em solução salina de HANKS contendo 100 U. O. de penicilina G e 100 μg de di-hidrestreptomicina por mililitro. Amostras de vírus: tipo "O" de VALLÉE, adaptado em cobaia, cepa 1 de 20-11-51, de PIRBRIGHT, Inglaterra; virus "C" de WALDMANN, tambem adaptado em cobaia, cepa GC de 16-11-51 da mesma procedência; vírus "C" de WALDMANN, obtido em matadouro, de inoculação em língua, para a fabricação da vacina do Instituto Biológico. Sôros específicos preparados na Seção de Imunologia do Instituto Biológico.

TÉCNICA

A técnica que passamos a descrever apresenta a conveniência de poder ser preparada em qualquer tipo de laboratório de pesquisas biológicas, pois não exige aparelhamento de difícil aquisição. Denominamos "técnica do esfregaço" porque a suspensão celular é distendida sôbre a superfície de vidro dos recipientes de cultura, em oposição às outras técnicas, que podem ser chamadas de "técnica por sedimentação", em que as células são deixadas sedimentar.

Depois de anestesiadas e sangradas, as cobaias são colocadas em decúbito ventral; os rins são extraídos por incisão dorsal. Estes são libertos da capa de gordura e da cápsula conjuntiva, e dissecados de modo a separar a camada cortical da zona medular. Descarta-se esta última, porque abunda em tecido conjuntivo. Os fragmentos do córtex renal são lavados demoradamente e picados finamente com tesoura. Preferimos tesoura para cirurgia de cornetos não só por permitir fazer a operação dentro de um tubo de centrífuga, mas

tambem porque o encurvamento do cabo permite que as mãos do operador fiquem em posição mais baixa do que a boca do tubo, evitando contaminações. Depois de várias lavagens em solução salina tamponada, os fragmentos de tecido são colocados em solução de tripsina 1:250 a 0,25 por cento em solução salina tamponada, e incubados a 37°C por 20 minutos. Em seguida, a solução de tripsina, turva de detritos celulares diversos, é substituida por uma nova, aquecida a 37°C. Com o auxílio de uma seringa de vidro aspiram-se e premem-se os fragmentos de tecido suspensos na solução de tripsina até que sejam reduzidos a uma densa suspensão de células, aglomerados celulares e pequenos fragmentos de túbulos e glomérulos. Esta suspensão é centrifugada a cêrca de 1.000 rotações por minuto, durante 5 minutos; o excesso de tripsina é retirado, deixando-se sòmente um volume equivalente ao do sedimento. Com auxílio de uma pipeta "Pasteur" de ponta recurva, o material é, depois de homogenizado, distendido em forma de estria longitudinal em relação ao eixo do tubo de cultura e ocupando cêrca de dois terços do comprimento dêste. Os tubos são colocados em banho gelado, em pé, por cêrca de vinte minutos, de modo que o excesso da solução de tripsina seja drenado para o fundo. As células e os aglomerados celulares aderem ràpidamente à superfície de vidro. Coloca-se um mililitro de meio de cultura em cada tubo, que, depois de arrolhado, está pronto para a incubação; esta pode ser estacionária ou rolante.

Depois de 72 horas o esfregaço converteu-se em um lençol de células contínuo e monoestratificado. Podem-se preparar cêrca de 160 tubos de 15 por 150 mm com os rins de uma cobaia recem-nascida.

As culturas podem ser utilizadas para a cultura do vírus aftoso, geralmente, a partir do quarto dia de incubação. Depois de prèviamente lavados com solução salina e inoculadas com 0,1 ml da suspensão de vírus, os tubos ficam cêrca de vinte minutos na temperatura ambiente. Nas provas de neutralização, a suspensão de vírus foi prèviamente tratada pelo sôro específico por cêrca de 30 minutos em banho gelado. Geralmente, de quatro a cinco tubos de cultura eram usados para cada diluição de vírus. A leitura dos resultados foi feita entre 15 e 18 horas depois da inoculação.

RESULTADOS

Obtivemos efeito citopatogênico evidente dos virus inoculados: tipos "O" e "C" adaptados em cobaia e "C" de orígem bovina. Êste efeito não se manifestou nas culturas inoculadas com suspensões

de vírus prèviamente tratadas com sôro específico, nem nos tubos de contrôle do meio e do sôro. Em três passagens, observámos efeito citopatogênico do virus "C" adaptado a cobaia, usando diluições de até um para milhão.

GUINEA PIG RENAL TISSUE CULTIVATED BY A NEW TECHNIQUE AND ITS SUSCEPTIBILITY TO THE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

Abstract

In this paper a simple method for obtaining epithelial sheets of kidney tissue for studies in virology is described. It is a variation of the methods for obtaining cell suspensions from fixed tissues (8) and from living organs (1, 2, 4, 6, 7, 10). The principal feature of the method is that the cells and clusters of cells are directly seeded on the inner glass surface of the test tubes or flasks, instead of in the culture media.

Method: The kidneys are cleaned and washed in phosphate buffer-solution, minced with scissors, washed again thoroughly in saline buffer solution and incubated 20 minutes at 37°C in a 0,25 per cent solution of trypsin 1:250. Afterwards, the old trypsin solution is discharged and replaced by a fresh one, prewarmed at 37°C. The tissue fragments are then turned into a thick suspension of minor fragments of uriniferous tubules and isolated cells by the to and fro movements of the plunger of a clinical syringe. The suspension is centrifugated at 1.000 rev/min., 5 minutes, the excess trypsin is discharged. With a bent tipped pipette the sediment is homogenized and smeared in the inner surface of the culture tubes to form a ribbon like layer occupying about two thirds of the tube. The cells and clusters of cells stick to the glass surface at once. When all the excess fluid has collected at the bottom of the tube, the fluid media is added, and the tubes are incubated at 37°C as stationary or roller tubes. After 72 hours the smear is converted in a almost uniform sheet of confluent epithelium.

One hundred and sixty test-tubes can be prepared with the kidneys of a guinea pig.

Evidence of susceptibility of the guinea pig renal tissue to the foot-and-mouth disease virus is given by the demonstration of the development of cytopathogenic effect in the cultures inoculated with type "O" and "C" virus of the guinea pig and type "C" of bovine origin.

BIBLIOGRAFIA

1) Dulbecco, R. — 1952 — Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38 (8): 747-52.

2) Dulbecco, R. & Vogt, M. — 1954 — Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99 (2): 167-82.

3) Evans, V. J., Earle, W. R., Sanford, K., Shannon, J. & Waltz, H. — 1951 — The preparation and handling of replicated tissue cultures for quantitative studies. *J. Nat. Cancer Inst.* 11: 907-26.

4) Moscona, A. — 1952 — Cell suspensions from organs rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.* 3 (3): 535-9.

5) Parker, R. C.; Healy, G. M. & Fisher, D. C. — 1954 — Nutrition of animal cells in tissue culture. VII — Use of replicate cell culture in the evaluation of synthetic media. *Can. J. Bioch. and Phys.* 32 (3): 306-18.

6) Rinaldini, L. M. — 1954 — A quantitative method for growing animal cell "in vitro". *Nature* 173 (4415): 1134-5.

7) Rinaldini, L. M. — 1954 — A quantitative method of cell culture. *J. Phys.* 123 (2): 20 P-21 P.

8) Rous, P. & Jones, F. S. — 1916 — A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues and for the plating out of individual cells. *J. Exp. Med.* 23: 549-55.

9) Sanders, F. K. — 1953 — Possible multiplication cycles in neurotropic viruses. *in*: *The Nature of Virus Multiplication.* 2nd *Symposium of the Soc. Gen. Micr. Oxford University, April 1952.* Cambridge University Press.

10) Youngner, J. S. — 1954 — Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85 (2): 202-5.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 6

Fig. 1 — Cultura de tecido renal de cobaia, com 5 dias de incubação.

Fig. 2 — Cultura de tecido renal de cobaia, com 5 dias de incubação e inoculada com virus aftoso tipo "O" de Vallée.

1
2

Vol. 24 — Artigo 13 Novembro de 1957

A DECOMPOSIÇÃO ESPONTÂNEA DE ALGUNS DERIVADOS INDÓLICOS

I — MÉTODOS EXPERIMENTAIS

POR

A. A. Bitancourt, Käthe Schwarz (1)

e

Alexandra Popoff Nogueira (1)

Do Instituto Biológico
e do Centro de Estudos sôbre o Cancer dos Vegetais

INTRODUÇÃO

No curso de estudos sôbre o metabolismo dos derivados indólicos nas plantas (SCHWARZ, NOGUEIRA e BITANCOURT 1956), tornou-se evidente que a decomposição espontânea dessas substâncias em solução, e mesmo no estado sólido, devia ser levada em conta para se poder interpretar corretamente a influência dos diferentes sistemas enzimáticos que, nos vegetais, agem sôbre essas substâncias.

E' fato conhecido que muitos derivados indólicos se decompõem lentamente em soluções, conforme se pode constatar pela mudança da sua côr e pela formação de precipitados. Soluções aquosas de ácido indolacético, por exemplo, incolores quando recem preparadas, tornam-se côr de rosa depois de alguns dias, formando mais tarde um precipitado de côr marron avermelhada. Outros compostos tornam-se amarelados ou pardos.

O estudo dos produtos da decomposição espontânea dos derivados indólicos é indispensável para uma boa compreensão da decomposição enzimática não somente porque muitos produtos dessas decomposições são os mesmos, como porque no decorrer das operações químicas e físicas exigidas pelo estudo das soluções incubadas, formam-se espontaneamente muitos desses produtos. E' portanto necessário saber distinguir o que é espontâneo do que resulta da ação enzimática.

Além disto, o fato de se tratar de produtos sintéticos que podiam empregar em quantidades relativamente grandes — pelo menos de alguns miligramas — permitiu aos autores aperfeiçoar as técnicas utilisadas, o que teria sido muito dificil com as quantidades, da ordem de algumas dezenas ou centenas de microgramas com que se costuma estudar as decomposições enzimáticas.

(1) Bolsistas de pesquisas do Conselho Nacional de Pesquisas.

No presente trabalho serão descritas com alguns pormenores as técnicas empregadas e aperfeiçoadas, ao passo que nos trabalhos seguintes desta série serão tratados sucessivamente os diversos derivados indólicos sintéticos que os autores puderam adquirir.

SUBSTÂNCIAS EMPREGADAS E SUAS SOLUÇÕES

A maior parte das substâncias que foram utilizadas nesta série de trabalhos foram adquiridas no comércio, de diversas casas especialistas, principalmente dos Estados Unidos. Outras foram gentilmente cedidas por diversos colegas ou preparadas pelos autores. Os produtos eram cristalinos ou amorfos e ligeiramente coloridos, tendo a coloração, em alguns casos, se tornado mais escura com o tempo. Alguns produtos como o indolacetonitrila apresentavam-se com o aspeto de uma resina muito escura, quase preta.

Tanto para o estudo de reações coloridas como para a preparação de cromatogramas e ionogramas, os derivados indólicos foram dissolvidos em solventes apropriados, empregando-se geralmente a água quando a substância era nela solúvel. Alguns derivados indólicos, como o ácido indolacético, são pouco solúveis na água fria e suas soluções aquosas foram preparadas levando a água até quase o ponto de ebulição. Em alguns casos a água distilada empregada era submetida previamente à ebulição durante 10 minutos a fim de eliminar o ar dissolvido. Foram tambem preparadas soluções em tampão de fosfatos de diversos pH, na concentração M/10, ou em soluções alcalinas como o hidroxido de sodio N/10 ou o bicarbonato de sodio na concentração molar equivalente.

Diversas concentrações das soluções foram utilisadas de acôrdo com o fim a que se destinavam. Soluções estoques foram geralmente preparadas na concentração de 1 para mil, conservadas em refrigerador, em frascos de vidro de paredes escuras, ou colocados dentro de cartuchos de papel preto, e diluidas à concentração desejada no momento do emprego. Em alguns casos cobriu-se a solução estoque com uma camada de 2 a 3 mm de oleo de parafina para protege-la da oxidação.

DECOMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES

O estudo das soluções decompostas foi feito quer com soluções envelhecidas — e por conseguinte decompostas espontaneamente, inclusive quando conservadas a baixa temperatura — quer em soluções em que a decomposição era provocada pela luz ultravioleta ou por agentes oxidantes como o cloreto férrico.

A decomposição pela luz U.V. foi geralmente feita da seguinte maneira: 3 cm^3 de uma solução a 1 para mil, em agua, fervida ou não, previamente, ou em solução alcalina ou tamponada, eram colocados em um vidro de relogio a 15 cm de uma lâmpada a vapor de mercurio Hanovia Utility do tipo S-100. De acôrdo com os dados fornecidos pelo fabricante, esta lâmpada emite o máximo de energia em 366mμ. Nesse comprimento de onda a energia por cm^2, a 50 centímetros de distância é de 70 microwatts. A 15 cm ela deve teoricamente ser cêrca de 10 vezes maior, ou 0,7 miliwatts. A irradiação era feito por tempo variável, sem, em geral, ultrapassar 10 minutos.

Em muitos casos a irradiação das substâncias pela luz U. V. foi feita diretamente no papel do cromatograma ou ionograma antes da cromatografia ou eletroforese, às vêzes com o papel umedecido, mas quase sempre com o papel sêco. A distância da lâmpada e o tempo de exposição eram os mesmos do que no caso das soluções. Por meio de uma "cache" de papel preto somente uma parte do "spot" ou faixa da substância era irradiado, quando conveniente.

PREPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS E IONOGRAMAS

Foi utilisado para a cromatografia e a eletroforese o papel Whatman N.º 1, sendo as fôlhas de 18 1/4" por 22 1/2" cortadas do tamanho conveniente. O papel era sempre lavado antes de usado, no caso da cromatografia com os proprios solventes usados na operação e no da eletroforese, sucessivamente com agua e com acetona. A lavagem era feita por cromatografia "em branco" nos recipientes utilisados nesta operação, mas bem entendido sem aplicação de qualquer substância no papel. No caso de cromatografia a duas dimensões a cromatografia "em branco" era feita nas duas dimensões, com os mesmos solventes usados na cromatografia propriamente dita.

Para comparar os resultados da cromatografia com os da eletroforese, alguns cromatogramas foram feitos com papel filtro impregnado com o tampão de fosfato usado na eletroforese.

As soluções frescas ou decompostas foram aplicadas no papel filtro diretamente ou — como foi frequentemente o caso para as soluções aquosas — depois de transferência das substâncias para butanol normal. Para este fim, 3 cm^3 da solução eram sacolejados com 0,5 cm^3 de butanol normal. A maioria dos derivados indólicos, altamente solúveis em butanol, passa quase que integralmente da água para o butanol o que resulta numa concentração de quase 6 vezes a concentração inicial, facilitando a aplicação no papel filtro.

CROMATOGRAFIA SÔBRE PAPEL

Foram sempre empregados cromatogramas de pequenas dimensões, com percurso "util" do solvente — ou seja a distância percorrida pelo solvente desde o ponto onde a substância foi aplicada até o lugar alcançado pela frente do solvente no final da cromatografia — de aproximadamente 10 cm (BITANCOURT 1955).

Nos cromatogramas a duas dimensões assim como em muitos dos a uma dimensão, as soluções foram aplicadas numa area circular de 0,4 cm de diâmetro que absorve aproximadamente 1 microlitro. A aplicação era feita com uma pipeta munida de uma fina ponta capilar, repetindo-se a operação tantas vezes quanto fosse necessário para colocar a quantidade de substância desejada. Quando se tinha de aplicar mais de uma vez a pipeta no papel, êste era colocado sôbre uma platina aquecedora não muito quente, a fim de apressar a volatilisação do solvente.

Tanto nos cromatogramas a uma como nos a duas dimensões foram aplicadas, lado a lado, para fins de comparação, além das soluções em estudo, soluções de substâncias sintéticas. No caso dos cromatogramas a duas dimensões esta aplicação era feita antes da primeira cromatografia, — caso este em que o cromatograma era recortado, entre a primeira e segunda cromatografia, a fim de destacar a banda longitudinal que continha as substâncias sintéticas de comparação, — ou antes da segunda cromatografia, numa area do cromatograma reservada para este fim.

Em muitos cromatogramas a uma dimensão as soluções não foram aplicadas num círculo e sim numa faixa transversal de 4mm de largura. Era este sempre o método de aplicação adotado quando se queria dividir o cromatograma terminado em tiras longitudinais, cada uma delas destinada a receber um reagente diferente, como será explicado adiante.

Foi utilisado exclusivamente o método ascendente com o solvente contido no fundo de uma caixa de Petri colocado na base de um recipiente cilíndrico. Sempre que se usou a agua como solvente, a atmosfera do recipiente era saturada com vapores de ácido acético. Para êste fim, os fundos de duas caixas de Petri de diâmetros diferentes eram colocados, um dentro do outro, no fundo do recipiente, a caixa externa contendo uma solução de ácido acético a 10% e a interna a agua. Para melhor saturar o ambiente com os vapores do solvente, duas tiras de papel, com êle embebidas, eram dispostas verticalmente contra as paredes do recipiente onde aderiam por capilaridade.

Os cromatogramas a uma dimensão eram suspensos na parte superior do recipiente e tinham a base mergulhada no solvente. Os

cromatogramas a duas dimensões eram enrolados na forma de um cílindro com as bordas reunidas por um grampo metálico ou por dois nós de fio de linha.

Em alguns casos o cromatograma não foi mergulhado imediatamente no solvente e sim somente depois de permanência de algumas horas (à noite toda por exemplo) dentro do recipiente de cromatografia, a fim de "equilibrar" o cromatograma (NITSCH e NITSCH 1955).

Foram usados como solventes: 1.º Água destilada, em atmosfera saturada de vapores de ácido acético (BITANCOURT 1953); 2.º Acetona-agua, na proporção 8:2; 3.º Isopropanol-amoniaco a 28%-agua, nas proporções 8:1:1.

Devido às pequenas dimensões dos cromatogramas que, conforme dissemos acima, tinham mais ou menos 10 cm de percurso "util", a cromatografia era extremamente rápida ou seja, no caso da agua mais ou menos uma hora, menos para a acetona e mais para o isopropanol. No papel lavado previamente a cromatografia é mais rápida, principalmente se ela se fizer no sentido das fibras do papel, indicado pelo fabricante.

ELECTROFORESE SÔBRE PAPEL

A electroforese sôbre papel foi feita no aparelho Elphor (FISCHER 1954) que possui duas cubas, em cada uma das quais podem se colocar duas tiras de papel filtro de 28 x 4 cm. Cada fôlha de papel Whatman n.º 1 de 18 x 22" fornece 16 tiras de papel com essas dimensões.

As tiras de papel eram previamente lavadas, primeiramente com água e depois de sêcas, com acetona, por meio de duas cromatografias "em branco", como no caso do papel para cromatografia.

As soluções, decompostas ou não, eram aplicadas no centro da tira de papel sêco, numa faixa transversal de 0,5 cm de largura, tantas vezes quanto era necessário para se depositar a quantidade desejada da substância estudada, conforme foi explicado para a cromatografia. Em alguns casos, parte da faixa assim preparada era submetida à luz U. V. para provocar a decomposição da substância aplicada.

Em seguida a tira de papel filtro era dobrada ao longo da faixa de deposição da solução e segurada nêsse lugar por duas laminas de vidro apertadas entre os dedos. Mergulhava-se então as extremidades da tira de papel assim reunidas num tampão de fosfatos M/10, de pH 7, deixando fora do tampão uns poucos centimetros que eram rapidamente saturados pelo tampão por capilaridade. Dessa

forma assegurava-se que o tampão alcançasse a faixa de aplicação simetricamente, de cada lado, evitando-se uma cromatografia, mesmo curta, das substâncias.

As cubas do aparelho Elphor recebiam o mesmo tampão e as tiras, depois de montadas no respetivo suporte, eram nelas colocadas. Ajustava-se o aparelho para uma voltagem de 140 volts e a operação tinha a duração média de 6 horas.

Em alguns casos, partes escolhidas dos ionogramas eram recortadas, costuradas com uma máquina de costura entre duas tiras de papel filtro de tamanho conveniente e o conjunto era submetido a nova eletroforese ou a uma cromatografia.

LOCALIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS NOS CROMATOGRAMAS E IONOGRAMAS

Alguns dos produtos de decomposição dos derivados indólicos têm côr escura e aparecem nos cromatogramas e ionogramas como manchas de côr rosea, amarela ou parda quando examinadas à luz do dia. A maior parte desses derivados, entretanto, só podem ser vistos, por inspeção direta dos cromatogramas, quando iluminados com luz U. V. Para êste fim o papel, depois de sêco, era examinado em câmara escura, à luz de uma lâmpada Mineralight modelo SL 3660, munida de um filtro que deixa passar quase exclusivamente a luz U. V. de 366 mμ de comprimento de onda. O contorno das manchas, "spots", zonas ou faixas transversais, era traçado com lapis de grafite.

Alguns produtos não fluorescentes ou com fluorescência insuficiente eram detectados no cromatograma ou ionograma graças à sua absorção da luz U. V. emitida por uma lâmpada Mineralight modelo SL 2537 cujo filtro deixa passar principalmente a luz de onda de 254 mμ.

Partes escolhidas dos cromatogramas e ionogramas eram em seguida expostas à luz U. V. da lâmpada Hanovia acima mencionada, para provocar a decomposição das diversas substâncias separadas pela cromatografia ou eletroforese.

REAÇÕES COLORIDAS SÔBRE O PAPEL FILTRO

Os cromatogramas e ionogramas, irradiados ou não em parte ou totalidade, foram submetidos a testes coloridos com diferentes reagentes (SCHWARZ, DIERBERGER e BITANCOURT 1955). Para este fim embebia-se uma fôlha de papel filtro espêsso (papel para xarope) com a quantidade suficiente de reagente e o cromatograma era aplicado contra essa tira de forma a absorver uniformemente o reagente em toda a superfície.

Nos ionogramas e nos cromatogramas a uma dimensão em que as substâncias eram aplicadas numa faixa transversal de alguns centímetros, os testes coloridos foram em geral realizados da seguinte maneira:

A fôlha de papel filtro, coberta com uma "cache" de papel preto que deixava descobertas faixas paralelas em toda a extensão do ionograma ou da parte "util" do cromatograma, era exposta à luz U. V. da lâmpada Hanovia durante o espaço de 10 minutos. Em seguida o cromatograma ou ionograma, era cortado em tantas tiras longitudinais quantos eram os testes a que se queria submete-lo, tendo-se o cuidado de que houvesse em cada tira uma faixa não exposta e uma faixa exposta à luz U. V.

Em regra os testes aplicados às tiras de papel eram os seguintes:

1.º Uma das tiras era aplicada contra uma fôlha de papel filtro embebida com uma solução de safranina em etanol a 96°, na concentração de 0,2 por mil.

2.º Outra tira recebia, da mesma forma, uma solução N de ácido clorídrico.

3.º Uma terceira tira recebia o reagente de SALKOWSKI (cloreto férrico M/2 6 cm^3, ácido sulfúrico concentrado 100 cm^3, agua 200 cm^3), o reagente de GORDON e WEBBER (cloreto férrico M/2 2 cm^3, ácido perclórico a 10% 100cm^3) ou uma solução de cloreto férrico M/50.

4.º A quarta tira recebia uma solução etanólica saturada de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH).

A caracterisação das substâncias diretamente sôbre o papel filtro por reações coloridas foi às vezes completada ou confirmada pela eluição dos "spots" e zonas, e utilisação do eluado em "spot tests" em placa de porcelana escavada ou por reações em tubo de ensáio.

DISCUSSÃO

A decomposição dos derivados indólicos em soluções aquosas, espontânea ou provocada por irradiação por luz U. V. ou ainda por substâncias químicas como o cloreto férrico, faz se principalmente por oxidação. Segundo verificamos essa decomposição é muito retardada quando a solução é preparada com agua privada de ar dissolvido, por ebulição durante alguns minutos, o que parece indicar que uma parte relativamente considerável do oxigenio utilisado na oxidação é o que está em solução na água.

A natureza dos produtos de decomposição é modificada de acôrdo com o pH da solução. Para tornar comparável os resultados da

cromatografia com os da eletroforese foi preciso impregnar o papel usado em cromatografia com o mesmo tampão de fosfatos utilisado na eletroforese. A presença ou ausência de gazes dissolvidos no solvente tambem modifica a natureza dos produtos de decomposição conforme se pode verificar imediatamente pela coloração que a solução assume e mais precisamente pelo estudo cromatográfico e eletroforético das soluções decompostas em agua previamente fervida ou agua naturalmente arejada. E' possivel que, pelo menos em parte, a diferença seja devida ao pH da agua que em presença de gaz carbônico torna-se mais baixo.

O papel Whatman n.º 1 contêm substâncias solúveis nos solventes utilisados em cromatografia que se concentram na parte superior dos cromatogramas ascendentes, formando uma linha com forte fluorescência azul. Esta fluorescência é aumentada quando se expõe o papel, a sêco, à luz U. V. São essas substâncias que, pelo menos em parte, conferem ao papel a sua fluorescência levemente azul, a qual fornece um fundo onde se destacam como manchas escuras, sob a luz U. V. de onda curta (254mμ) os derivados indólicos desprovidos de fluorescência propria, mas que absorvem os ráios U. V. de curto comprimento de onda. Este contraste é sensivelmente aumentado quando se impregna o papel com uma substância, como a safranina, que fluoresce com luz U. V. de onda curta. Os derivados indólicos não fluorescentes destacam-se como manchas azuis escuras sôbre o fundo brilhantemente vermelho da safranina.

Os inconvenientes da presença no papel de substâncias solúveis nos solventes empregados, são entretanto muito grandes. O aumento da fluorescência do papel pela acumulação dessas substâncias na parte superior do cromatograma pode obliterar completamente a fluorescência dos produtos cromatografados de Rf elevado de modo a não permitir a sua detecção. Estas substâncias tambem interferem na eluição dos "spots" e zonas pois as quantidades delas extraídas pela eluição são em geral muito superiores às da substância que se quer eluir. Estes inconvenientes é que tornam necessária a lavagem prévia do papel dos cromatogramas e ionogramas. Lavagens repetidas, entretanto, não retiraram completamente essas impurezas do papel, uma das razões que tornam a eluição a técnica a menos satisfatória entre as que empregamos.

A principal técnica utilisada nos nossos estudos é a da cromatografia sôbre o papel. As dimensões dos cromatogramas que empregamos são muito menores que as usualmente utilisadas em cromatografia. As vantagens dos cromatogramas de pequenas dimen-

sões são consideráveis e sobrepujam completamente os seus inconvenientes. Estas vantagens são as seguintes:

1.º Maior facilidade de manipulação.

2.º Menor tamanho dos recipientes de cromatografia que ocupam menor espaço no laboratório.

3.º Facilidade de exposição à luz U. V. e de aplicação de reagentes.

4.º Maior rapidez de operação, vantagem esta especialmente importante quando se trata de cromatografar substâncias instáveis que se decompõem durante a cromatografia.

5.º Economia do uso de papel, solventes e reagentes.

A essas vantagens opõe-se, ao nosso ver, um único inconveniente, a menor separação entre as diversas substâncias. Esta desvantagem dos cromatogramas de pequenas dimensões é entretanto quase anulada pelo fato de que a difusão das substâncias aumenta com o tempo de cromatografia, os "spots" tornam-se maiores e as zonas mais largas. De outro lado, a decomposição das substâncias instáveis tambem aumenta com o tempo, dando lugar a "rastros" cada vez mais extensos. A comparação do tamanho dos spots dos nossos cromatogramas a duas dimensões com 10 cm de percurso "util", com os grandes cromatogramas que ilustram publicações de outros autores (cf. BENTLEY et al, 1956) mostra que o tamanho relativo desses spots, ou seja a sua relação com o percurso util — relação esta que, em última análise, determina o gráu de separação entre as substâncias — é aproximadamente o mesmo, ou seja da ordem de 1/5 a 1/12.

Nenhum dos solventes utilisados em cromatografia, nem a eletroforese, permitiram a separação completa dos produtos de decomposição dos derivados indólicos estudados. O isopropanol amoniacal, o mais usado pelos diversos autores que estudaram os derivados indólicos cromatograficamente, foi o solvente que nos deu os resultados menos satisfatórios e parece pouco recomendável para a cromatografia de substâncias instáveis. No caso do ácido indolpirúvico ele forma caudas e não separa bem os diversos produtos de decomposição que se acham, na sua maioria entre os Rfs 0,60 e 0,90. Obtivemos as melhores separações de produtos da decomposição do ácido indolpirúvico com a água, em atmosfera saturada de vapores de ácido acético, e dos do ácido indolacético com a eletroforese e a cromatografia com acetona-agua. Este ultimo solvente separa bem todos os produtos de decomposição do ácido indolacético insolúveis n'água e que por isto ficam juntos no ponto de partida quando se utilisa êsse solvente.

Uma condição essencial para a reproducibilidade dos resultados da cromatografia é a perfeita saturação do ambiente nos recipientes e isto se aplica tambem ao papel filtro ainda sêco, acima da frente do solvente. Somente no fim de algumas horas o papel está "equilibrado" com o ambiente e diversos autores têm por hábito deixar os cromatogramas algumas horas dentro do recipiente, sem contáto com o solvente. Conseguida a "equilibração" o cromatograma é abaixado de forma a mergulhar sua base dentro do solvente, sem que esta operação necessite a abertura do recipiente (NITSCH e NITSCH 1955). Por essencial que seja a equilibração para a consecução de resultados uniformes, ela tem graves inconvenientes na cromatografia de substâncias instáveis. Principalmente no caso dos cromatogramas a duas dimensões, a demora considerável que a equilibração exige, faz com que as substâncias mais instáveis sejam totalmente decompostas e desapareçam dos cromatogramas, ficando no seu lugar os produtos de decomposição. Por este motivo raramente lançamos mão dessa medida, preferindo os inconvenientes das variações consideráveis de Rf que se verificam com certos solventes como a acetona quando não é feita uma prolongada equilibração antes da cromatografia.

A instabilidade de certos produtos apresenta os seus maiores inconvenientes na cromatografia a duas dimensões. Nela a mesma substância apresenta mais do que um "spot". Um deles, que designamos por "spot primario" é produzido pela própria substância existente na solução original. Os outros, os spots secundários, são produzidos por cada um dos precursores da substância em questão. E' muito dificil, nos cromatogramas a duas dimensões, distinguir o spot primario dos spots secundários de uma mesma substância. SCHWARZ e BITANCOURT (1957) entretanto, mostraram que quando o mesmo solvente é usado nas duas dimensões (cromatogramas duplos) o spot primario acha-se exatamente na linha de iguais Rfs que, num cromatograma ideal em que o solvente circularia rigorosamente do mesmo modo na primeira e na segunda cromatografias, é a diagonal do quadrado que constitui a superfície util do cromatograma. Nos cromatogramas duplos, os spots secundários não somente não complicam a interpretação, como dão indicação sôbre os precursores da substância correspondente. O mesmo acontece com os "rastros" no sentido da primeira cromatografia. Eles resultam da decomposição durante a primeira cromatografia, da substância de Rf (em segunda dimensão) correspondente. O rastro se inicia no precursor da substância, sôbre a diagonal do cromatograma e se estende até o Rf (na primeira dimensão) da referida substância.

A decomposição dos derivados indólicos induzida pela luz U.V. é aproveitada para melhor caracterisar os "spots" ou zonas dos cromatogramas e ionogramas. Partes escolhidas desses spots ou zonas são expostos à luz U.V. durante 10 minutos, sendo o restante do cromatograma ou ionograma protegido por uma fôlha de papel preto. Substâncias como o ácido indolacético, que não possuem fluorescência própria, contêm substâncias fluorescentes entre os seus produtos de decomposição e seus spots tornam-se visíveis à luz U.V. Em meio neutro ou ácido, o ácido indolacético irradiado manifesta uma fluorescência azul pálida, em meio alcalino a fluorescência adquirida é muito mais intensa e de coloração verde turquesa. As substâncias fluorescentes frequentemente se transformam, sob o efeito da luz U. V., em substâncias igualmente fluorescentes, porem de côr diferente. A exposição à luz U.V. permite dessa forma não somente caracterisar melhor os "spots" das diversas substâncias, como também às vezes, determinar o primeiro produto de decomposição da substância em estudo.

As mesmas modificações induzidas pela luz U.V. manifestam-se nas reações coloridas efetuadas sôbre o papel do cromatograma com diversos reagentes. Por exemplo a dinitrofenilhidrazina pode produzir uma mancha marrom na zona correspondente a uma determinada substância, exclusivamente na faixa exposta à luz U. V. Isto significa que entre os produtos de decomposição da substância deve achar-se um derivado cetônico ou aldeídico. De um modo geral toda a propriedade da faixa exposta à luz U. V. que não se observa na faixa não irradiada pertence aos produtos de decomposição da substância correspondente e não a esta última. De outro lado, a supressão de uma propriedade pela luz U.V. indica a decomposição total da substância correspondente. Todos esses fatos ajudam na caracterisação dos diversos produtos separados por cromatografia ou eletroforese e na determinação da ordem ou sequência de sua decomposição.

Certos derivados indólicos comportam-se como indicadores, incolores em meio neutro, "viram" em meio ácido, apresentando côr característica. Estes derivados são "revelados" por impregnação dos cromatogramas ou ionogramas com ácido cloridrico normal. A oxidação dos derivados indólicos pelo $FeCl_3$ produz diversos desses derivados que são os que dão a coloração característica dessas substâncias com os reagentes de SALKOWSKI e de GORDON e WEBER. Os mesmos derivados indólicos, coloridos em meio ácido, são encontrados na decomposição espontânea ou provocada pela luz U.V.

SPONTANEOUS DECOMPOSITION OF SOME INDOLE DERIVATIVES. I. EXPERIMENTAL METHODS

Abstract

Solutions of several indole derivatives, more or less decomposed by aging, were submitted to chromatographic and electrophoretic studies. Decomposition was also much more rapidly induced by ultra-violet irradiation or by oxydizing agents such as ferric chloride. The solutions were prepared from the synthetic products in an appropriate solvent, usually water, pure or buffered at pH 7, and in some cases deprived of its dissolved air by prolonged ebullition.

Ascending chromatography was performed in short (10 cm usable travel of the solvent) paper (Whatman n.º 1) chromatograms previously washed with the solvent used in the operation by means of a blank chromatography. This removed most of the fluorescent substance contained in that paper which interferes with readings of fluorescent spots, especially at the higher Rf's.

The solutions were applied with a fine-point pipette on a 4 mm circle (containing approximately 1 µl) or, as was often the case with one-dimensional chromatograms, on a 4 mm wide band, crosswise to the chromatogram, in part or all of its width. Application was repeated as often as necessary in order to deposit the required amount of the solution, usually the equivalent of from 4 to 20 µg of the undecomposed product per 4 mm circle. The solvents used were:

a) water, in an atmosphere saturated with vapours of acetic acid; b) isopropanol-28% ammonia-water 8:1:1; c) acetone water, 8:2. Two-dimensional chromatograms were run with the same solvent in both directions (double chromatograms) or with two different solvents in succession.

Ionograms were prepared with 28 × 4 cm strips of Whatman n.º 1 paper, the solutions being applied at the center of the strip in a 4 mm band across its whole width. The strip was next moistened with M/10 phosphate buffer at pH 7, and placed in the Elphor apparatus containing the same buffer solution. A voltage of 140 volts was applied during 6 hours.

Ionochromatograms were prepared by sewing a strip of the ionogram containing part or all of the bands separated by electrophoresis in between two strips of fresh filter paper with a sewing machine and running the chromatogram.

The dried chromatograms and ionograms were inspected under U.V. light of long wave (366 mµ) or short wave (254 mµ)

U. V. lamps with appropriate filters. Fluorescent spots seen with the first of these lamps and dark spots (the result of suppression of the back ground fluorescence of the filter paper) seen in short wave light were outlined with a lead pencil. Usually part or all of the ionograms or chromatograms was submitted to U. V. irradiation in order to induce further decomposition of the decomposition products, thus changing their fluorescence and chemical properties. The ionograms and chromatograms were next submitted to several reagents. The routine procedure for one-dimensional chromatograms and ionograms was usually as follows:

The sheet of paper was submitted to U. V. irradiation through a stencil of black paper in which parallel longitudinal strips had been cut out so that as many strips of irradiated and non-irradiated areas were produced. The sheet was then divided in 4 longitudinal strips, each of which containing lengthwise an irradiated and a non-irradiated portion. The following reagents were then applied to the strips:

1.º A 2/10,000 solution of safranin. Non-fluorescent substances which absorb short wave U. V. light showed as dark blue bands, contrasting with the bright red safranin fluorescence under the short wave U. V. lamp.

2.º N chlorhydric acid. Substances which behave as indicators immediately acquired their characteristic color in acid medium.

3.º A ferric chloride reagent (Salkowski, Gordon and Weber, or a M/50 solution of $FeCl_3$).

4.º A saturated solution of 2,4-dinitrophenylhydrazine in ethanol. Brown bands appeared at places containing aldehydic or ketonic compounds.

Reactions were also performed in tubes or porcelain spot plates with solutions eluted with appropriate solvents from spots or bands selected from chromatograms and ionograms.

BIBLIOGRAFIA

BENTLEY, J. A., FARRAR, K. R., HOUSLEY, S., SMITH, G. F., & TAYLOR, W. C. — 1956 — Some chemical and physiological properties of 3-indolylpyruvic acid. *Biochem. J.* 64: 44-49.

BITANCOURT, A. A. — 1953 — Identificação das auxinas por cromatografia e eletroforese em papel (resumo). *Ciência e Cultura* 5: 199.

BITANCOURT, A. A. — 1955 — Recherches physiologiques sur les auxines. *Rev. Gén. Bot.* 62: 498-598.

FISCHER, A. — 1954 — Über die Papierchromatographische und Papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten. Planta 43: 288-314.

NITSCH, J. P., & NITSCH, C. — 1955 — The separation of natural plant growth substances by paper chromatography. *Beitr. zur Biol. der Pflanz.* **31**: 387-408.

SCHWARZ, K. & BITANCOURT, A. A. — 1957 — Paper chromatography of unstable substances. *Science* **126**: 607-608. 1957.

SCHWARZ, K., DIERBERGER, R., & BITANCOURT, A. A. — 1955 — Estudos sôbre o cancer vegetal. I. A natureza química das auxinas de alguns tecidos vegetais normais e tumorais. *Arq. Inst. Biol.* **22**: 93-118.

SCHWARZ, K., NOGUEIRA, A. P., & BITANCOURT, A. A. — 1956 — Decomposição enzimática do triptofana e do ácido indolacético pelo extrato de ponteiros de abacaxi. (resumo). *Ciência e Cultura* **8**: 176.

A DECOMPOSIÇÃO ESPONTÂNEA DE ALGUNS DERIVADOS INDÓLICOS

II — ÁCIDO INDOLPIRÚVICO

POR

Käthe Schwarz (1) e A. A. Bitancourt

Do Centro de Estudos sôbre o Cancer dos Vegetais
e do Instituto Biológico

Com 3 figuras no texto

INTRODUÇÃO

O ácido indolpirúvico (AIP) é geralmente considerado como um produto intermediário do metabolismo da triptofana. STOWE e THIMANN (1953) demonstraram a sua presença no extrato de endosperma de milho e VLITOS e MEUDT (1954b) em fôlhas de soja e de fumo. Ele foi tambem constatado em tecidos de tomateiro tratados com triptofana (VLITOS e MEUDT 1954a). No metabolismo dos derivados indólicos nas plantas, o ácido indolpirúvico encontra o seu lugar natural na cadeia de reações que vai da triptofana ao ácido indolacético (BONNER e WILDMAN 1947).

Tudo indica portanto que o AIP desempenha um papel importante nas plantas, quer como precursor de auxinas, como o ácido indolacético (AIA) e outras substâncias fisiologicamente ativas nas plantas, quer por efeito proprio nos sistemas fisiológicos, o que entretanto ainda não foi demonstrado.

O AIP decompõe-se rapidamente em soluções aquosas e esta decomposição que é apressada pela exposição das soluções à luz do dia ou melhor à luz ultravioleta, pode ser acompanhada num espectrofotometro em luz ultravioleta (STOWE 1955, SCHWARZ 1957). O método cromatográfico, entretanto, é preferivel neste gênero de estudos pois ele separa os diversos produtos de decomposição que podem ser caracterisados por propriedades físicas e químicas.

Este método permitiu a BENTLEY, FARRAR, HOUSLEY, SMITH e TAYLOR (1956) de estudar algumas propriedades fisiológicas e químicas do AIP. No presente trabalho apresentamos o resultado do estudo pelos métodos de cromatografia e eletroforese sôbre papel dos produtos da decomposição espontânea do AIP. Deste estudo, que revelou a presença de um número de produtos de decomposição superior ao que foi encontrado pelos citados autores, são tiradas conclusões

(1) Bolsista de pesquisas do Conselho Nacional de Pesquisas

sôbre a natureza química desses produtos e a sequência de sua formação.

Uma parte do equipamento de laboratório utilisado nestas experiências foi doado pela Rockefeller Foundation. Agradecemos aos Srs. Dr. K. V. THIMANN que nos comunicou o trabalho inédito de BRUCE STOWE, de seus laboratorios, que acima citamos, e nos cedeu uma amostra de AIP, à Dra. JOYCE A. BENTLEY a quem devemos outra amostra de AIP com a qual realizamos verificações dos resultados obtidos com a primeira amostra, e ao Prof. HEINRICH HAUPTMANN que muito nos ajudou com conselhos e críticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilisamos principalmente uma amostra de AIP sintetisada pelo Dr. A. EK. Segundo o rótulo do frasco que recebemos do Dr. THIMANN, o AIP nessa amostra está na forma enólica e tem ponto de fusão de 211-213°. Esta mesma amostra foi utilisada por STOWE no trabalho acima citado. Recentemente recebemos da Dra. JOYCE BENTLEY uma amostra que é provavelmente a que foi utilisada por ela e seus colaboradores no trabalho acima citado (1956).

Os produtos de decomposição estudados foram os que se formaram espontaneamente em soluções aquosas, depois de um tempo variável de conservação em refrigerador no escuro à temperatura aproximada de 5° C. Para o estudo do produto tão puro quanto possível, isto é com a decomposição apenas iniciada, foram utilisadas soluções em metanol, imediatamente depois de preparadas.

Os métodos experimentais gerais utilisadas foram descritos detalhadamente no primeiro trabalho da presente série (BITANCOURT, SCHWARZ e NOGUEIRA 1957). Eles compreenderam a cromatografia e a eletroforese sôbre papel. O estudo espectrográfico das soluções pelo primeiro autor foi publicado em separado (SCHWARZ 1957).

A cromatografia e a eletroforese foi feita: 1) diretamente com as soluções aquosas; 2) com as frações neutra e acida dessas soluções; 3) com os eluados de "spots" e zonas escolhidos de cromatogramas e ionogramas. O fracionamento foi geralmente efetuado da seguinte maneira: A 1 cm^3 da solução aquosa de AIP juntaram-se 20 cm^3 de eter bidestilado que foi em seguida sacolejado com 5 cm^3 de bicarbonato de sódio a 1%. No eter permaneceu a fração neutra e a solução de bicarbonato foi acidulada a pH 3, sendo em seguida extraida duas vezes com 20 cm^3 de eter que constituiram a fração ácida.

A cromatografia foi feita pelo método ascendente, usando como solventes a agua destilada, em atmosfera saturada de vapores de ácido acético, a mistura isopropanol-amoniaco a 28%-agua na proporção 8:1:1 e a mistura acetona-agua na proporção 8:2. Foram preparados cromatogramas unidimensionais com cada um dos solventes e cromatogramas bidimensionais em que eram utilisados dois solventes diferentes, um para cada direção de cromatografia, ou o mesmo solvente aplicado nas duas direções (cromatografia dupla: SCHWARZ e BITANCOURT 1957).

A eletroforese sôbre papel foi feita no aparelho Elphor, empregando-se sempre o tampão de fosfatos de pH 7, na concentração M/10.

Os cromatogramas e ionogramas foram revelados: 1) pela sua fluorescência em luz U. V. de onda longa (366 mμ); 2) pela supressão da fluorescência do fundo claro devido à própria fluorescência do papel filtro, ou do fundo fluorescente vermelho do papel impregnado de safranina, nos dois casos observada em luz U. V. de onda curta (254 mμ); 3) pelas reações coloridas com os reagentes de SALKOWSKI, de GORDON e WEBER, a fucsina (FEIGL 1954) e a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH).

Em muitos casos as reações sôbre papel foram confirmadas ou verificadas por "spot-tests" em placa de porcelana ou reações em tubo de ensáio das substâncias eluidas dos "spots" ou zonas dos cromatogramas uni- ou bi-dimensionais com os mesmos reagentes. No caso de DNFH por exemplo, os spots fluorescentes, delineados com lapis de grafite, foram recortados e eluidos com 0,5 cm^3 de etanol. A este volume do eluado foi acrescentado 1 cm^3 de uma solução saturada de DNFH em etanol. Depois de 15 minutos no banho-maria, acrescentou-se hidróxido de sódio até obter forte reação alcalina. Em outros casos o "spot" recortado foi colocado diretamente dentro de 1 cm^3 do reagente.

As diversas substâncias separadas pela cromatografia ou eletroforese foram designadas por números. Na discussão dos resultados estes números designam tanto os spots propriamente ditos como as substâncias presumiveis, correspondentes.

RESULTADOS

De todos os derivados indólicos estudados o AIP mostrou-se o mais instável. Ele é pouco solúvel n'água e sua solução aquosa

começa a se decompor espontaneamente dentro de alguns minutos depois de preparada. No prazo de algumas horas, as soluções, a principio incolores, tornam-se amarelas, até côr de laranja. A cromatografia e a eletroforese permitiram revelar a presença de mais de 10 produtos de decomposição.

A fig. 1 representa um cromatograma duplo, ou seja um cromatograma a duas dimensões em que o mesmo solvente — no caso

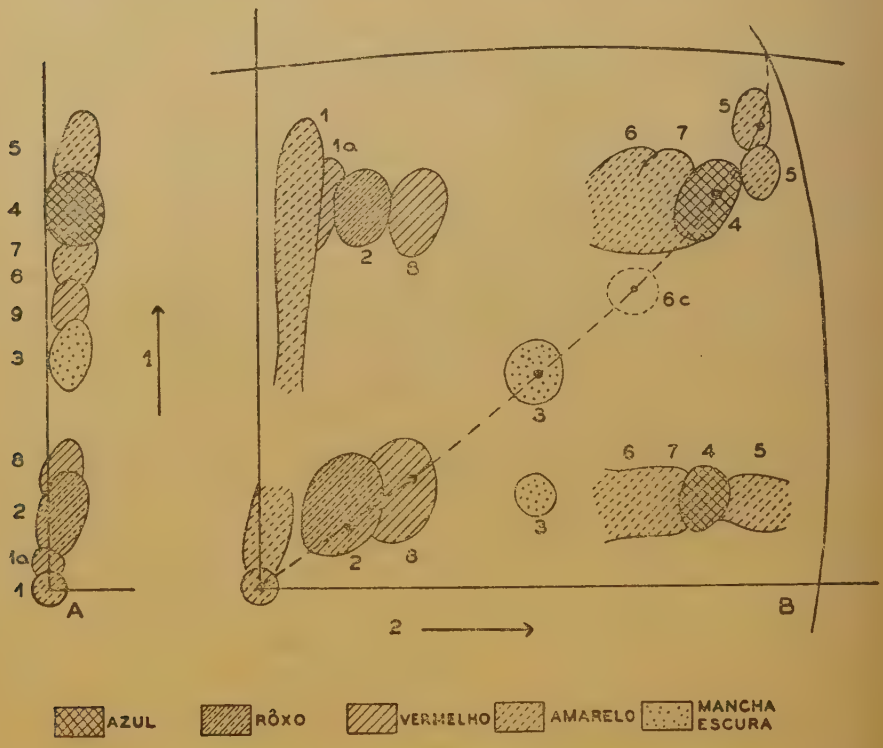


Fig. 1 — Cromatograma duplo de uma solução de AIP decomposta. A agua, em atmosfera de vapores de ácido acético, foi utilisada como solvente nas duas direções. A, distribuição dos spots depois da primeira cromatografia. B, depois da segunda cromatografia. Os "spots" primarios, isto é, os das substâncias que se achavam na solução original distribuiram-se ao longo da "diagonal" do cromatograma, indicada por um traço interrompido. Todos os outros spots são secundarios e pertencem às substâncias formadas a partir das substâncias dos spots primarios, entre as duas cromatografias. As hachuras indicam a coloração da fluorescência em luz U. V. de 366 mμ. Os spots 3 não são fluorescentes e são vistos como manchas escuras sob a luz U. V. de 254 mμ. O spot 6c foi visto somente após aplicação do reagente de Salkowski ao cromatograma

a agua pura, em atmosfera saturada de vapores de ácido acético — é aplicado nas duas direções de cromatografia. Neste cromatograma, representativo de muitos que foram feitos com este solvente e com soluções mais ou menos envelhecidas de AIP, foram utilisadas cêrca de 30 μg de AIP, numa solução de metanol de 3 a 4 dias. Embora a solução tivesse sido todo o tempo conservada no escuro, à temperatura de cêrca de 5°, salvo por curtos momentos em que era retirada do refrigerador para tomada de pequenas quantidades para estudo, o cromatograma revela a presença de numerosos produtos de decomposição.

Já depois da primeira cromatografia (fig. 1, A) era possível distinguir 9 zonas diferentes, graças à sua distribuição, contornos e côr própria de fluorescência. Na segunda cromatografia algumas das substâncias desapareceram e outras se desdobraram em várias outras. O centro dos spots primários (SCHWARZ e BITANCOURT 1957) foram indicados por um ponto preto. Eles se acham naturalmente distribuidos ao longo da linha de iguais Rfs que designamos por diagonal. Ela foi representada em traço interrompido. Todos os outros spots são secundários, isto é, correspondem a substâncias produzidas pela decomposição, entre a primeira e segunda cromatografia, da substância cujo spot primário se acha na mesma linha horizontal. Na linha horizontal da substância 2, por exemplo, reconhecem-se o spot primário desa substância — na diagonal do cromatograma — e os spots secundários das substâncias, 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Na linha horizontal da substância 4 vê-se, além do seu spot primário, na diagonal, os spots secundários das substâncias 1, 1a, 2, 5, 6, 7 e 8. Nas linhas horizontais dos spots primários 3, 5, 7 e 8, não há spots secundários de outras substâncias. A fluorescência amarela, carateristica, do spot 6 não era visivel sôbre a diagonal, mas no seu lugar o reagente de SALKOWSKI produziu um spot côr de rosa, indicando a presença de uma substância indólica, não fluorescente que designamos por 6 c. A substância 9 tambem desapareceu depois da primeira cromatografia e a substância 1 forma um extenso rastro de Rf O em quase toda a extensão do cromatograma.

A fig. 2 representa um exemplo de cromatograma bidimensional em que o primeiro solvente é a agua em atmosfera de ácido acético e o segundo uma mistura acetona-agua. A fig. 2 A representa a distribuição dos spots depois da primeira cromatografia e a fig. 2 C a de uma cromatografia unidimensional com acetona-agua. Baseados nos Rfs das diversas substâncias, com acetona e com agua, indicamos

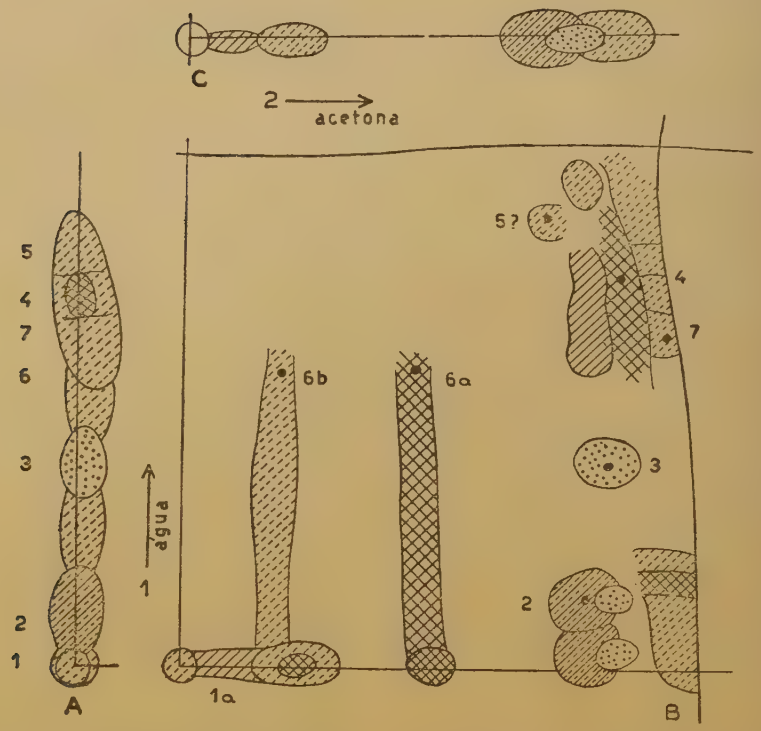


Fig. 2 — Cromatograma bi-dimensional de uma solução decomposta de AIP. A agua em atmosfera de ácido acético e o solvente acetona-água (8:2) foram utilisados na primeira e na segunda cromatografia, respectivamente. A, distribuição dos spots depois da primeira cromatografia. B, depois da segunda cromatografia. C, em outro cromatograma em que o solvente acetona-agua foi utilisado. As hachuras convencionais da fig. 1 foram usadas para representar as cores de fluorescência e a absorção de luz U. V. Os spots primários, deduzidos dos Rfs das diversas substâncias nos dois solventes, foram indicados por um ponto preto

por um ponto preto o centro do spot primário das substâncias 2, 3, 4, 5, 6a, 6b e 7. A acetona separou o spot 6 da primeira cromatografia em dois componentes, 6a e 6b que formaram um rastro desde o Rf O até o Rf de 6 da primeira dimensão. A acetona tambem separou o spot 1 em diversos componentes.

A fig. 3 é um exemplo típico de ionograma de AIP. A solução foi distribuida numa faixa de 4 × 0,5 cm. A eletroforese foi feita

em tampão de fosfatos M/15, pH 7, durante 9 horas, com uma diferença de potencial de 140 volts, no aparelho Elphor. Por sua fluorescência 10 bandas transversais puderam ser identificadas. O diagrama tambem representa as modificações que se fizeram nessa fluorescência depois de exposição de metade do ionograma à luz U. V., durante 10 minutos. A correspondência com os produtos de decomposição separados pela cromatografia somente foi possível estabelecer para alguns deles. Para os outros o número correspondente é seguido de um ponto de interrogação. Uma só substância, muito provavelmente 3, deslocou-se para o lado do polo negativo, mas isto é possivelmente devido à eletro-osmose. O lugar da aplicação da solução decomposta era ainda visivel, no fim da eletroforese, como uma mancha parda. Esta mancha corresponde ao spot 1 dos cromatogramas com agua-ácido acético, o qual é composto de mais de uma substância. A grande maioria das substâncias, movimentaram-se para o lado do polo positivo e isto pode tambem ser o caso de uma ou outra substância da zona 1 que aparentemente ficou no ponto O somente por efeito da eletro-osmose.

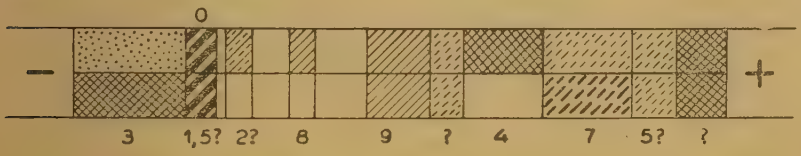


Fig. 3 — Ionograma de uma solução decomposta de AIP. A faixa de aplicação da solução, indicada por um zero, foi hachurada com traços espessos. As demais hachuras são as usadas na fig. 1, mas em alguns casos foram mais acentuadas para indicar maior intensidade da fluorescência. As correspondencias com os números dos cromatogramas foram indicadas por baixo das zonas respetivas. Na parte superior estão indicadas as zonas observadas imediatamente depois de terminado e seco o cromatograma, na parte inferior as modificações sofridas por estas zonas em seguida à exposição do ionograma à luz U. V. durante dez minutos

A tabela 1 condensa os resultados destes cromatogramas e do ionograma, e de muitos outros, assim como as reações coloridas dos diversos spots ou de seus eluados. Foram tambem indicados os precursores provaveis e os possiveis produtos de decomposição dessas diversas substâncias.

Não foram indicados na tabela os resultados dos "spot-tests" com a fucsina e com o cloreto férrico, os quais entretanto serão mencionados na discussão.

TABELA 1

Propriedades das substâncias correspondentes às zonas e spots dos cromatogramas e ionogramas preparados com soluções decompostas de ácido indolpiruvico

Spots	Presença na fração etérea		Rf (x100) [a]			Eletroforese [b]	Fluorescência		Reagentes		Precursores	Produtos	Identidade
	neutra	acida	agua	isopropanol	acetona		antes de U. V.	depois de U. V.	Salkowski	DNFH			
1	+	+	0	85	20	0	amarela	—	amarelo laranja	—	todos?	6a, 6b	dímeros?
1a	+	+	3		10	11	vermelha	—	vermelho	—	1,4		
2	desaparece		15	33 25	71		roxa	—	roxo	++	4	todos menos 1a	AIP (forma cetônica
3	+	—	35-40	85	80	—7	(absorção)	azul	roseo	++	2	9?	dímero? (diester)
4	—	+	80	25 45	82	76	azul		roxo	—	2	todos menos 3	AIP (forma enólica)
5	desaparece		85	85-95 75	85?	0	amarela	—	amarelo	+	2,4	1, 6a	Aldeido indolacético?
6a	+	—	55-60	95 75	32		azul	(aumenta)	roseo	+	5,1	6b	Aldeido indoleninoacético
6b	+	+	65	95 65	90?	80	amarela	—	—	—	7	6c?	
6c	—	+	65	55	83	80	(absorção)	azul	roseo	—	9,6b		AIA
7	—	+	72	75 25,95	90?	92	laranja		amarelo laranja	—	2,4	6b	Ácido indolático?
8	—	+	23				vermelha		—	—	2,4		
9	+	+	45-50	95		60			roseo	—	3	6c	

a) Os algarismos separados por um traço de união dão os valores minimo e maximo da zona ocupada pela substância. Os que estão separados por uma virgula, são os Rfs de dois spots diferentes correspondentes à substância que só apresentava um spot nos cromatogramas com água-ácido acético. Os algarismos da linha de cima são dos Rfs dos spots principais.

b) os valores indicados são as distâncias em mm a partir do ponto de aplicação, de uma eletroforese, tomada a título de exemplo.

DISCUSSÃO

A cromatografia e a eletroforese permitiram separar pelo menos 12 produtos diferentes existentes nas soluções decompostas de AIP. A maior parte desses produtos devem ser produtos de oxidação do AIP. Dois deles, numerados 2 e 4, destacam-se pelo seu comportamento nos cromatogramas duplos como o da fig. 1. Ambos apresentam nas linhas horizontais correspondentes aos respectivos spots primários na diagonal, spots secundários de quase todas as substâncias presentes no cromatograma. Isto significa que 2 e 4 se decompuzeram em quase todas as outras substâncias entre a primeira e a segunda cromatografia. Além disto a substância 2 produziu 4 e esta última produziu 2. As soluções muito frescas, isto é, cromatografadas poucos minutos depois de preparadas, contêm principalmente a substância 2 cujo eluado dá com DNFH uma reação de côr marrom que, com o acrescimo de algumas gotas de hidroxido de sodio N passa para a côr de vinho. Este carater assim como o comportamento de 2 nos cromatogramas, indica que esta substância é a forma cetônica do AIP. A substância 4, que produz 2 durante a cromatografia, deve ser a forma enólica do mesmo ácido. Ela dá com o cloreto férrico uma coloração rosea intensa que indica a presença de um grupo enólico na sua molécula. A mesma reação com a substância 2 se explica pela transformação muito rápida de 2 em 4.

Nas soluções envelhecidas de AIP, as formas enólicas e cetônica devem estar em equilibrio. A separação das duas substâncias por cromatografia rompe êsse equilibrio, o que explica o aparecimento de 4 entre os produtos de decomposição de 2 e desta última nos da substância 4. Isto tambem explica a presença de quase todos os mesmos produtos de decomposição nas linhas horizontais de 2 e de 4 do cromatograma da fig. 1. A grande instabilidade de 2 se traduz pela extrema variação dos espectrogramas dessa substância em luz U. V. (SCHWARZ 1957).

Embora a amostra de AIP que recebemos do Dr. THIMANN seja da forma enólica, a presença da forma cetônica em quantidades maiores do que a primeira nos nossos cromatogramas de soluções frescas explica-se pela rápida formação da forma cetônica a partir da enólica, conforme mostrou STOWE (1955) trabalhando com a mesma amostra. Acompanhando espectrofotométricamente a reação da DNFH que caracteriza a forma cetônica, STOWE constatou o aumento progressivo da côr nos 20 primeiros minutos, findo os quais houve diminuição até um valor fixo de aproximadamente 75% do maximo observado. Simultaneamente STOWE constatou o desaparecimento da

forma enólica pela descoloração do 2,6-diclorofenolindofenol em tubo de Thunberg evacuado. No fim de 50 minutos a solução contem praticamente somente a forma cetônica. Mesmo numa solução utilisada imediatamente depois de feita, o tempo que decorre entre a dissolução e a terminação da cromatografia é amplamente suficiente para que a maior parte do AIP passe da forma enólica original, para a forma cetônica, visivel nos nossos cromatogramas como o spot 2.

As duas substâncias que, em seguida a 4, aparecem com maior rapidez nas soluções de AIP em início de decomposição são 3 e 5. A substância 3 provem unicamente de 2 e é destituida de fluorescência. Os seus spots, entretanto, são visiveis quando examinados à luz U.V. de onda curta (254 mμ) como uma mancha escura que resulta da supressão da fluorescência azul pálida do papel filtro. Iluminado com raios U. V., 3 adquire uma fluorescência azul. E' uma substância estável que dá a reação da DNFH e fica na fração neutra das soluções fracionadas. E' provavelmente 3 que aparece no lado negativo dos ionogramas como uma zona de fraca fluorescência azul (fig. 3). Como êsse deslocamento é possivelmente devido à eletro-osmose, 3 deve ser uma substância neutra, o que sugere uma cadeia lateral destituida de grupos eletronegativos. Isto poderia ser o resultado da formação de um di-ester entre o carboxila de uma molecula da forma enólica do AIP e o alcool secundário de outra, e vice-versa. STOWE e THIMANN (1954) sugeriram que a ocorrência de uma auxina de peso molecular elevado, visinho de 370, nos extratos vegetais, assinalada por diversos autores, poderia se explicar pela formação de um dímero dêsse típo. A substância 3 dá uma reação positiva com DNFH, indicando um grupo cetônico, mas isto pode ser devido a uma facil hidrolise do dímero na presença do reagente. Pelo seu Rf em água-ácido acético, 3 poderia ser a substância que produz o spot 9 dos cromatogramas de BENTLEY *et al* (1956).

A substância 5 apresenta-se nos cromatogramas das soluções frescas, com fluorescência amarela intensa que desaparece espontaneamente depois de 24 horas ou rapidamente por exposição à luz U. V. Isto demonstra ser 5 uma substância instável, e explica o seu desaparecimento durante o fracionamento étereo. Êsse desaparecimento, pelo menos em parte, resulta da formação de uma substância insolúvel n'água que, nos cromatogramas duplos com este solvente (fig. 1) permanece no Rf 0, como parte do rastro formado durante a primeira cromatografia. A substância 5 apresenta uma reação fortemente positiva com a fucsina e a DNFH. Por estes caracteres e pela sua curva de absorção em luz U. V. (SCHWARZ 1957) esta substância poderia ser o aldeido indolacético. O seu Rf

em água-ácido acético e a sua fluorescência indicam que se trata provavelmente da substância que forma o spot 6 nos cromatogramas de BENTLEY et al (1956).

Alguns spots dos cromatogramas com água-ácido acético mostraram-se, quando cromatografados com isopropanol-amoniaco ou com acetona-água (fig. 2), compostos de mais de uma substância. É este o caso de 1 e de 6. O spot 1 é composto de substâncias insolúveis n'água que, nos cromatogramas com água-ácido acético, permanecem no ponto de partida. Desenvolvendo estes cromatogramas com acetona-agua ou isopropanol-amoniaco na segunda dimensão, aparecem nos seus Rf respectivos, as substâncias 2, 3, 6a, 6b e 7 (fig. 2) que são solúveis n'água. A explicação para este fato parece ser que as substâncias do spot 1 são dímeros insolúveis na água. Estes dímeros teriam, nos outros solventes o mesmo Rf que as substâncias originais ou então se hidrolisariam, produzindo essas substâncias no intervalo entre a primeira e segunda cromatografia. Que esta hidrolise já teria lugar durante a primeira cromatografia está demonstrado pelos rastros significativos de 6a e 6b na fig. 2. Tivessem tido esses rastros a sua origem na produção das respectivas substâncias unicamente por decomposição de 2, eles se iniciariam no Rf desta última e não no de 1. De outro lado, se 6a e 6b se tivessem formado durante a primeira cromatografia pela decomposição de 4, os rastros se estenderiam até o Rf desta última.

O spot 6 desdobrou-se em 3 spots distintos: 6a aparece geralmente com pouca intensidade nos cromatogramas preparados com a fração neutra das soluções fracionadas. Ele dá reação positiva com DNFH e uma reação duvidosa com a fucsina. A curva de absorção em luz U. V. sugere que se trataria de aldeido indolenino-acético (SCHWARZ 1957). 6b e 6c aparecem na fração ácida, possuindo o último os seguintes caracteres do ácido indolacético: Rf dêsse produto nos três solventes, reação de SALKOWSKI positiva nos cromatogramas de seu eluado no isopropanol e desenvolvimento de fluorescência azul nos spots submetidos à irradiação U. V. durante 10 minutos. Deve-se notar porém que 6c não manifesta a reação de SALKOWSKY nos cromatogramas com água-ácido acético, em que ele está junto com 6a e 6b que parecem interferir com essa reação. Depois de separadas essas substâncias pela segunda cromatografia com isopropanol-amoniaco, entretanto, a reação de SALKOWSKI aparece em Rf 0,55, caraterístico do ácido indolacético nas nossas condições de trabalho.

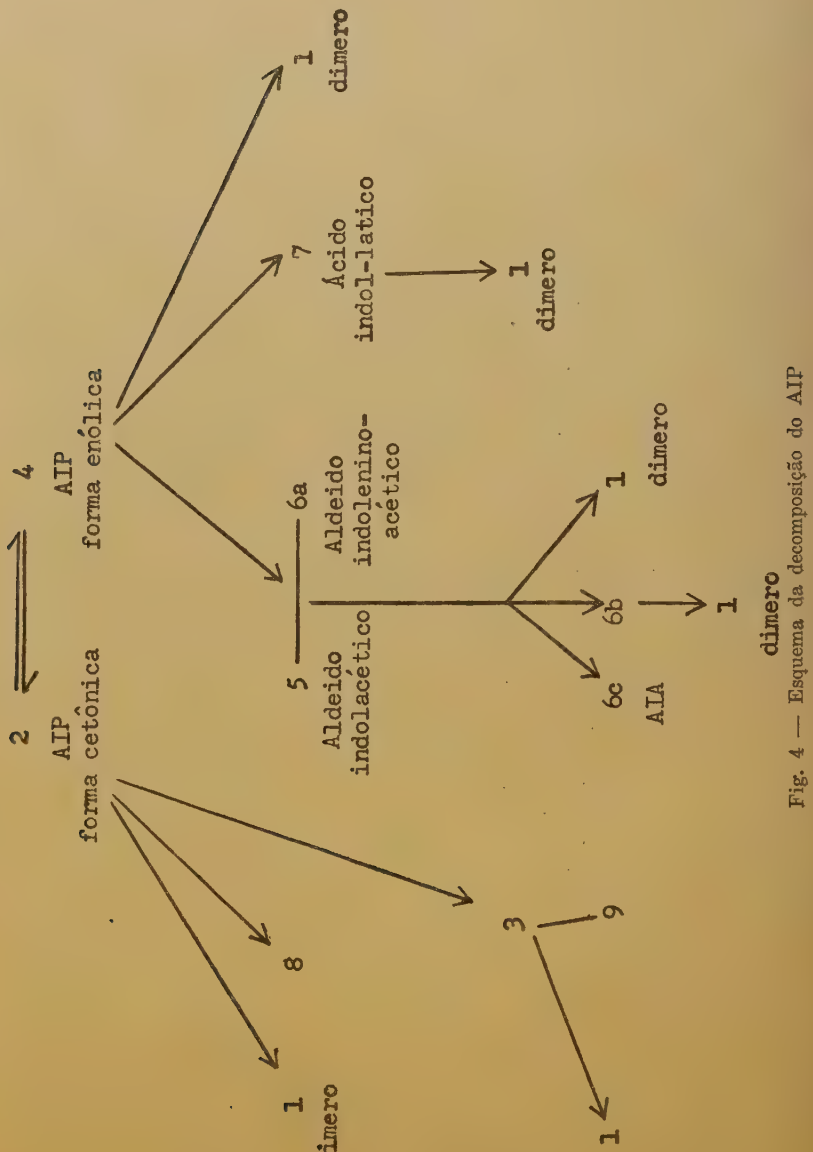


Fig. 4 — Esquema da decomposição do AIP

A substância 7 que passa para a fração ácida no fracionamento etéreo das soluções de AIP, tem fluorescência amarela-laranja e dá uma coloração amarelo-laranja com o reagente de SALKOWSKI. Esta é a côr da reação com o ácido indol-lático. Conforme foi sugerido pelo Dr. THIMANN (2) o AIP poderia por oxido-redução produzir de um lado o aldeido indolacético e de outro o ácido indol-lático.

A substância 9 comporta-se como um indicador. Ela possui côr vermelha em meio ácido, sendo visivel, ocasionalmente, em cromatogramas e ionogramas, como um spot ou zona côr de rosa, à luz do dia. Esta coloração passa para o amarelo sob a ação de vapores de amoniaco. Como 5, 9 se insolubilisa facilmente, participando o produto insolúvel do rastro de 1 no cromatograma duplo da fig. 2. Este caráter o separa facilmente de 3, que lhe é visinho nos cromatogramas com agua-ácido acético.

Os spots 1a e 8 têm fluorescência vermelha fraca e não possuem caracteres que permitam sequer uma sugestão quanto à sua identidade química.

Em resumo podemos representar a decomposição do AIP nos diversos produtos revelados pelos nossos cromatogramas com o esquema da pagina 194.

Abstract

THE SPONTANEOUS DECOMPOSITION OF SOME INDOLE DERIVATIVES. II. INDOLEPYRUVIC ACID.

Paper chromatography and paper electrophoresis have been used to separate the substances in aged solutions of indole-3-pyruvic acid. The experimental methods have been described in the first paper of this series.

As shown by double chromatograms (Schwarz and Bitancourt 1957) two substances, 2 and 4, produced between the first and second chromatography almost all the break-down products already present in the original aged solution of IPyA (Fig. 1). Also 2 produced 4 and 4 produced 2. Eluates of 2 give a dark brown reaction with 2-4-dinitrophenylhydrazine (DNFH), which turn burgundy red by addition of sodium hydroxide. Substances 2 and 4 are considered the keto and the enol-form of IPyA, respectively.

Substance 3 is produced from 2 exclusively. It is not fluorescent but strongly absorbs short wave U. V. light. After exposure to U. V. it acquires a faint blue fluorescence. It is stable, gives

(2) Carta de 7 de Maio de 1956 ao segundo autor.

a positive reaction with DNFH and remains in the neutral fraction of solutions of IPyA. The possibility that 3 might be a dimer, e. g. a di-ester of IPyA is discussed. Substance 5 is unstable, has strong reactions of an aldehyde (DNFH, fuchsin) and its U. V. absorption curve (Schwarz 1957) suggests the possibility that it be indoleacetaldehyde.

Spot 6 (in water-acetic acid) is separated into 6a, 6b and 6c by isopropanol and by acetone. 6a gives the aldehyde reaction and by its U. V. absorption curve it has been suggested that it might be indolenine-acetaldehyde (Schwarz 1957). 6b and 6c are acidic and 6c has all the properties of indoleacetic acid, inclusive the pink Salkowski reaction which however does not occur when 6c is associated with 6a and 6b, as in the water-acetic acid chromatograms.

Spot 1 behaves like 2 and 4 in two-dimensional chromatograms using water-acetic acid in the first direction and isopropanol or acetone in the second direction, i. e. it produces several of the decomposition products and also 2. It is suggested that 1 is a mixture of dimers of those products.

The characters of the spots are discussed and their identity is suggested.

BIBLIOGRAFIA

Bentley, J. A., Farrar, K. R., Housley, S., Smith, G. F., & Taylor W. C. — 1956 — Some chemical and physiological properties of 3-indolylpyruvic acid. *Biochem. J.* **64**: 44-49.

Bitancourt, A. A., Schwarz, K., & Nogueira, A. P. — 1957 — A decomposição espontânea de alguns derivados indólicos. I. Métodos experimentais. *Arq. Inst. Biol.* **24**: 169-182.

Bonner, J., & Wildman, S. G. — 1947 — Contribution to the study of auxin physiology. Sixth Growth Symposium. 51-68.

Feigl, F. — 1954 — Spot tests. Volume II. Organic applications. Elsevier Publ. Co. Amsterdam. 436 pp.

Schwarz, K. — 1957 — Espectrografia dos produtos da decomposição espontânea do ácido indolpirúvico. *Arq. Inst. Biol.* **24**: 81-91.

Schwarz, K., & Bitancourt, A. A. — 1957 — Paper chromatography of unstable substances. Science **126**: 607-608.

Stowe, B. B. — 1955? — Behavior of indole pyruvic acid. (Manuscrito inédito comunicado pelo Dr. K. V. Thimann).

Stowe, B. B., & Thimann, K. V. — 1953 — Indolepyruvic acid in maize. *Nature* **172**: 764.

Stowe, B. B., & Thimann, K. V. — 1954 — The paper chromatography of indole compounds and some indole-containing auxins of plant tissues. *Arch. Biochem. & Biophys.* **51**: 499-516.

VLITOS, A. J., & MEUDT, W. — 1954a — The role of auxin in plant flowering. II. Methods for the extraction and quantitative chemical determination of free 3-indole-acetic acid and other indole compounds from plant tissues. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 17: 401-411.

VLITOS, A. J., & MEUDT, W. — 1954b — The role of auxin in plant flowering. III. Free indole acids in short-day plants grown under photoinductive and nonphotoinductive daylengths. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 17: 413-417.

Vol. 24 — Artigo 15 Novembro de 1957

CARÊNCIA DE COBALTO EM BOVINOS
I — ESTUDO CLÍNICO E DEMONSTRAÇÃO EXPERIMENTAL DA EXISTÊNCIA DA DOENÇA NO BRASIL

POR

René Corrêa

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 7 a 14

SUMÁRIO

1 — Histórico e Generalidades
2 — O cobalto na nutrição dos ruminantes
3 — Estudo clínico da doença no Estado
4 — Técnica de trabalho
5 — Experiências realisadas
a) - análise de fígado
b) - análise de forragens
c) - análise de solos
6 — O cobalto como fator de correção da doença
7 — Distribuição geográfica da doença no Estado
8 — Discussão
9 — Conclusões
10 — Bibliografia.

1 — *Histórico e Generalidades*

Os primeiros colonisadores da Nova Zelandia e da Austrália que criavam carneiros e bovinos em suas propriedades, notavam que esses animais depois de determinado tempo de pastoreio, de 3 a 5 mêses, nas invernadas de certas áreas, perdiam o apetite, emagreciam lentamente, e após uma série de sintomas de malnutrição morriam de definhamento, embora estivessem colocados em luxuriantes pastagens. A remoção dos animais doentes para outras invernadas, consideradas de qualidade inferior àquelas tidas como "doentes", produzia a completa recuperação.

Na Nova Zelandia foi descrita em 1923 por REID uma doença já citada por GILRUTH, na localidade de Mamaku, que acometia carneiros e bovinos, conhecida vulgarmente por "bush sickness", e que se caracterizava por caquexia, letárgica e anemia, morrendo os animais por completa exaustão. Acentuava REID, que conhecia muito bem este síndrome e tambem a opinião de veterinários patologistas, que o "bush sickness" não era uma doença no sentido ordinário da palavra, mas um estado de desnutrição resultante de alguma causa ainda desconhecida, pois, tôdas as tentativas artificiais feitas para infetar animais falharam completamente. ASTON (12, 13, 14, 15, 16, 17) depois de uma série de interessantes investigações sobre a etiologia do "bush sickness", considerou esta doença como sendo uma deficiência de ferro em consequência da suposta pobreza dêste elemento nos pastos afetados e usava como tratamento curativo e profilático o citrato de ferro amoniacal. Mais tarde o proprio ASTON

(18, 19, 20) preconizou o uso da limonita, que é um óxido de ferro hidratado, misturado ao sal comum dado aos animais, em vista dos bons resultados obtidos em várias experimentações. A suposição desta carência de ferro foi tambem admitida por ASKEW e RIGG (11), e estes mesmos autores (92) verificaram que a administração aos animais de pequenas quantidades de terra de lugares sadios não só curava a doença como tambem ao mesmo tempo prevenia o seu aparecimento no rebanho.

Nos Estados Unidos BECKER e cols. (25) descrevem uma doença conhecida sob o nome de "salt sick" acometendo principalmente bovinos na zona da Florida, e caracterizada por perda do apetite ou apetite depravado, emaciação, fraqueza, palidez das mucosas, maturidade sexual retardada, às vezes diarréa, apresentando os animais em algumas ocasiões, nos exames *post-mortem*, areia nos estomagos; ocasionalmente ocorriam parasitas que podiam agravar a condição. Os animais quando removidos para outras invernadas saravam completamente. NEAL e cols. (86) e BECKER e cols. (25) verificaram que a administração só de ferro aos animais não era suficiente para cura-los. NEAL e BECKER (84, 85) verificando a variação do teôr de hemoglobina no sangue dos animais doentes de "salt sick", a escassez de ferro nas forragens e nos solos das áreas atingidas, e a similaridade existente entre o "bush sickness" da Nova Zelandia, o "pining" da Inglaterra e o "nakuruitis" de Kenia, consideraram a causa deste síndrome como sendo uma deficiência de ferro complicada com a de cobre.

Na Inglaterra é conhecida pelos nomes de "pine", "pining" e "vinquish", desde 1807, uma doença definhante que acomete carneiros e bovinos; é tida como uma condição de emaciação, anemia e perda do apetite. Os animais doentes, principalmente os novos, que são os mais susceptiveis, quando levados para áreas consideradas sadias, curam-se rapidamente. Varias eram as opiniões sobre a etiologia desta doença e foi constatada em diversos centros.

MCGROWAN e SMITH (74) em 1922 verificaram que esta doença não era limitada a um determinado tipo de solo e sugeriram que a falta de algum fator necessário para os animais nos alimentos poderia ser a causa. GREIG e cols. (55) analisando solos de áreas afetadas em Tiree, concluiram que provavelmente a causa da doença denominada "pining" seria devido a uma deficiência de ferro no pasto ou de ferro util no solo. STEWART e PIERCY (104) inicialmente julgaram a causa da doença infestações parasitarias, porem em 1936, STEWART e PONSFORD (101) observaram que o número de vermes presentes nos animais doentes era insuficiente para produzir aquele grau

de anemia persistente e de emaciação observadas nos animais com "pining". Estes autores analisando forragens de áreas consideradas doentes, verificaram nas mesmas, deficiencias de cálcio, fósforo e ferro, em vista do que sugeriram que a causa da doença seria devido a uma combinação ou interação de malnutrição e infestação parasitária gastro-intestinal.

Em Kenia, na Africa, ocorre uma doença conhecida sob o nome de "nakuruitis", caracterizada por emaciação, fraqueza e anemia, em bovinos que pastam de 4 a 6 mêses em determinadas áreas no distrito de Nakuru. A doença é mais grave em certas épocas do ano; os animais novos são os mais sensíveis, e quando removidos para outras pastagens, muito se beneficiam.

Concomitantemente ocorria naquela época no distrito de Denmark, no oéste sul da Australia, uma doença que acometia carneiros e bovinos e que se caracterizava principalmente por um emagrecimento lento e progressivo, anemia, fraqueza, perda do apetite, alotriofagia e morte por definhamento. FILMER (46) descreve-a pela primeira vez em 1933 sob o nome de "marasmo enzootico", evidenciando que a doença era mais comum durante a primavera e princípios do verão, afetando particularmente os animais novos e de ambos os sexos e de tôdas as raças, citando sua similaridade com certas doenças caquéticas que ocorriam na Nova Zelandia, na Inglaterra, em Kenia e nos Estados Unidos; critica a teoria da deficiência de ferro, admitindo que a doença seria devido a carência de algum elemento mineral presente nos compostos de ferro e encontrado ser eficiênte no tratamento e na profilaxia. Lembrando a semelhança existente entre o marasmo enzootico e o "bush sickness" da Nova Zelandia, que na ocasião era considerado uma deficiência de ferro, FILMER e UNDERWOOD (48) começaram a investigar o uso de compostos de ferro em seu tratamento, pois a teoria da deficiência de ferro não era suficientemente satisfatória para explicar de modo convincente a etiologia das doenças semelhantes ao marasmo enzootico; assim no "nakuruitis" de Kenia uma intensa hemosiderose era notada, no "salt sick" da Florida a suplementação do ferro só era eficiente com acrescimo de cobre, e as constatações de RIGG e ASKEW (92) na Nova Zelandia mostravam que os resultados obtidos no tratamento e na prevenção do "bush sickness" com limonita e bebidas de solo de áreas sadias não dependiam unicamente do conteúdo de ferro nestes suplementos, em vista do que os autores, sem terem tido qualquer resultado satisfatório com este composto, começaram a estudar a ação curativa das várias frações de extratos ácidos da limonita. E verificaram que a ação curativa da limonita não era devida

ao ferro e sim às impurezas que existiam na limonita. UNDERWOOD (108) analisando orgãos de animais sadios e com marasmo enzootico constata, ao contrário do que se devia esperar, que o teôr em ferro era mais alto nos orgãos dos animais doentes do que nos sãos, concluindo que a doença não poderia ser devido a uma deficiência de ferro, mas sim à ausência nos alimentos de algum fator necessário para o seu aproveitamento no crescimento e na produção da hemoglobina. UNDERWOOD e FILMER (111) em 1935 experimentando em carneiros com marasmo enzootico as várias frações obtidas com ácido clorídrico diluido da limonita, verificam que o elemento potente que prevenia e curava a doença nos animais estava numa fração livre de ferro e composta de manganês, niquel, zinco e cobalto. Subsequentemente, após várias experimentações, constatam que o cobalto era o elemento que administrado aos animais os curava e ao mesmo tempo prevenia o aparecimento da doença no rebanho, concluindo portanto que o marasmo enzootico era devido a uma deficiência de cobalto nos alimentos. O gado era, segundo experiências feitas por FILMER e UNDERWOOD (49) e tambem por UNDERWOOD (109), curado e mantido em bôas condições de saúde pelo período de um ano com 0.3 a 1.0 miligrama de cobalto por cabeça e por dia. Posteriormente UNDERWOOD e HARVEY (112) e UNDERWOOD e BECK (110) verificaram tambem que o marasmo enzootico era uma carência de cobalto não complicada com a deficiência de cobre, pois os animais que recebiam só cobalto respondiam tão bem ao tratamento como aqueles que eram suplementados com os dois elementos.

Em 1929-30 a Divisão de Nutrição Animal da Austrália iniciava a investigação sôbre a etiologia e distribuição da "coast disease", que acometia carneiros e bovinos no sul da Austrália, síndrome que apresentava todos os sintomas de uma malnutrição, consistindo principalmente por perda de apetite, acentuada fraqueza, letargia, anemia, lã seriamente afetada no seu crescimento, ossos extremamente leves e frágeis. Várias hipóteses foram feitas sôbre a etiologia da doença e se inclinaram inicialmente para um desequilibrio do fósforo e de outros elementos essenciais devido a excessiva ingestão de cálcio contido nos alimentos. THOMAS (107) estuda a influência das condições geológicas e da composição do solo sobre a distribuição da "coast disease" dos carneiros, na ilha de Cangurú; depois de uma série de considerações sobre as teorias da relação do cálcio, do fósforo e de outros elementos minerais, tais como o manganês e o ferro, sugeriu em 1934, que a administração de compostos de cobalto poderia combater a anemia característica da doença, conforme havia sido demonstrado anteriormente por WALTNER e WALTNER (114) em 1929

e depois em 1932 por ORTEN e cols. (87), em trabalhos de laboratórios realisados em ratos, sobre a ação policitemica deste mineral. MARSTON (66) e LINES (65) em 1935 e depois MARSTON e cols. (69, 72) em 1938 verificaram que carneiros com a doença da costa quando recebiam 1 miligrama de cobalto por dia, mesmo *in extremis*, saravam completamente dentro de poucos dias. MARSTON e cols. (71) nesta ocasião fazem a mesma verificação e concluem assim sobre o efeito potente do cobalto nos animais doentes e sobre sua ação profilática. A administração do cobalto seja com o cobre, seja associado ao cobre e ao ferro restabelecia muitos dos carneiros em estado inicial de carência, mas aparentemente normais. Estes mesmos autores estudam em seguida o efeito do cobalto, cobre e outros elementos minerais em carneiros com a doença da costa e verificam que quando o cobalto e o cobre eram administrados isoladamente não respondiam satisfatoriamente, mas quando dados juntos produziam o bom desenvolvimento dos animais, preveniam a anemia, restabeleciam o apetite, etc., sugerindo com os dados experimentais obtidos, que a doença da costa era uma dupla carência de cobalto e cobre. MOORE (81) determinando realmente os valores do ferro e do cobre nos animais doentes com a "coast disease" e nos normais, verificou que os doentes possuiam no figado e outros orgãos, o teôr de ferro superior ao normal, ao passo que sempre encontrava no figado dos animais doentes o teôr de cobre abaixo da média normal.

Após as verificações de UNDERWOOD e FILMER (111) de um lado, e de LINES (65) e MARSTON e cols. (69, 71, 72) de outro, concluia-se evidentemente que as doenças de causa desconhecida que ocorriam em várias regiões, eram consequência da carência de cobalto nesses animais. Com esta descoberta, ou por outra, com a constatação da deficiência deste elemento mineral nos animais, e com a cura e prevenção do marasmo enzootico e da doença da costa pelo cobalto, na Austrália, foram estas descobertas rapidamente difundidas e confirmadas principalmente na Nova Zelandia, resolvendo assim um grande problema econômico.

Uma nova fase de estudos se inicia em seguida, na Nova Zelandia, com referência à carência de cobalto, com o aparecimento de trabalhos complementares e importantes sobre a carência deste elemento nos orgãos de animais doentes, nas forragens e no solo de regiões atingidas. RIGG e ASKEW (93) verificaram que a administração de extratos ácidos de solos de lugares sadios, pobres em ferro, porém ricos em cobalto, cobre e niquel, curavam e preveniam o desenvolvimento do "bush sickness".

BECKER e GADDUM (22), nos Estados Unidos, analisando duas amostras de limonita usadas na Nova Zelandia no tratamento do "bush sickness", verificaram que a amostra que curava os animais possuia 50 p.p.m. de cobalto, ao passo que a ineficiente não tinha nem traços.

ASKEW e DIXON (5) continuando esta linha de investigações, verificaram que com 8 miligramas de cobalto dados semanalmente aos animais doentes com "bush sickness", preveniam a doença em Glenhope. Estes mesmos autores (6) analisando quimicamente orgãos de animais sadios e doentes, constataram que enquanto os animais normais apresentavam um teôr de cobalto no figado igual a 0.07 a 0.25 p.p.m. sobre a matéria sêca, os doentes de "bush sickness" tinham apenas de 0.02 a 0.03 p.p.m.

ASKEW (4) analisando fígado de carneiros mantidos sadios em pastos considerados doentes, encontrou com a administração de solo ou de bebidas cobaltadas, os valores de 0.05 a 0.09 p.p.m. sobre a matéria sêca, deduzindo da experimentação feita que o conteúdo de cobalto igual a 0.05 p.p.m. encontrado no fígado era perfeitamente compatível com a saúde dos animais. O teôr de cobre no fígado dos animais com "bush sickness" estava sempre dentro dos limites normais.

Constatações foram feitas posteriormente por HOPKIRK (60), HOPKIRK e GRIMMETT (61), TAYLOR (106), MELROSE (79), MCNAUGHT (76, 77, 78), BONNER, MCNAUGHT e PAUL (27) e por FILMER (47), os quais concluiram que as denominações de "Bush Sickness", "Morton Mains Disease" e "Mairoa Disease", na Nova Zelandia, resultavam de uma carência de cobalto em consequência de sua deficiência nas forragens, o que por sua vez decorria da deficiência dos solos. Constatou-se portanto que a deficiência é em última análise do solo.

Com a descoberta na Austrália e com os trabalhos feitos na Nova Zelandia com referência à carência de cobalto nos carneiros e bovinos, PATTERSON (88, 89, 90), CORNER e SMITH (36), MITCHELL e cols. (80), STEWART (100) e STEWART e cols. (102, 103), na Inglaterra, depois de uma série de observações e experimentações deduzem que a doença de carater definhante denominada "pine" ou "pining" era prevenida e curada com a administração de cobalto.

Estas verificações foram tambem confirmadas nos Estados Unidos por trabalhos experimentais de GORTNER (54), DENHAM (41), NEAL e AHMAN (82, 83), RUSOFF e cols. (95), KILHAM (64) e outros, segundo os quais a condição observada no gado e conhecida por "salt sick" era consequência de uma dupla carência de cobalto e cobre.

2 — *O cobalto na nutrição dos ruminantes*

Os problemas relacionados com a deficiência de cobalto foram levados mais longe com os trabalhos de GALL e cols. (50, 51, 52, 53) relativos ao cobalto e a flora microbiana do rúmen. Estudando o conteúdo bacteriano do rúmen de carneiros verificam estes autores que os animais em carência de cobalto apresentavam um número muito inferior de bactérias por grama de conteúdo, em relação aos animais normais. A técnica de trabalho destes autores consistia na verificação da riqueza bacteriana do rúmen por meio de contagem diréta em lâminas, pela coloração de Gram e pela cultura em anaerobióse. A contagem diréta das bactérias feita pela coloração de Gram, em carneiros alimentados com cobalto, era caracterizada pela grande variedade de bactérias, com grande número de Gram positivas, bastonetes levemente encurvados e por tipos cocoides. Os animais com carência de cobalto eram reconheciveis pela completa falta de germes sob a forma de bastonetes levemente encurvados e por uma grande redução do número dos tipos cocoides. Havia, pois, uma grande diminuição da flora bacteriana do rúmen nos casos de carência de cobalto.

RICKES e cols. (91) relatam a importância do composto contido em extratos hepáticos e importante para o crescimento do Lactobacillus lactis de DORNE (LLD) e que é a vitamina B-12, com a propriedade de responder clínica e hematologicamente contra a anemia perniciosa adisoniana. E' um composto que se cristalisa em forma de pequenas agulhas vermelhas, que responde em quantidades de microgramas nas anemias, aumentando os glóbulos vermelhos, hemoglobina, etc.. A denominação de vitamina B-12 vem mais propriamente substituir a expressão usada primitivamente de "principio anti-anemia perniciosa" que havia surgido em face dessa função anti-anemica que de fato possue. A expressão de vitamina B-12 devia ser preferivel uma vez que a etiologia precisa da anemia resta a ser determinada. A nova vitamina poderá ter para o futuro o seu nome químico.

Esta vitamina foi por SHORB (96) demonstrada ser o mesmo fator requerido pelo LLD e encontrado nos extratos refinados de figado, cujo principio ativo foi mostrado ser terapeuticamente hematopoético em casos de anemia perniciosa. A pequena quantidade deste composto requerida para o crescimento do LLD coloca a vitamina B-12 entre os mais potentes compostos microbiologicamente ativos.

SMITH (97) analisando a cinza do fator da anti-anemia perniciosa, isolado sob a forma de cristais vermelhos, em forma de agu-

lhas, com reação especifica de côr vermelha, com o nitroso-R-sal, verificou estimando colorimetricamente com l-nitroso-2-naftol que este fator possuia 4 por cento de cobalto, elemento traço reconhecido como essencial para prevenir e curar em ruminantes um síndrome envolvendo anemia, e procedido da alimentação em pastagens deficientes em cobalto.

ABELSON e DARBY (1) observam que administrando cobalto aos carneiros havia um subsequente aumento de vitamina B-12 nas fezes, conforme dosagens feitas com o Lactobacillus lactis de Dorne e Lactobacillus leichmannii, concluindo com os trabalhos de GALL e cols. (50, 51, 52, 53) que o cobalto age como um potente estimulante para o crescimento de certas bactérias no rúmen de carneiros e supondo que estas bactérias sintetisam a vitamina B-12.

BECKER e cols. (21) e BECKER e SMITH (23,24) considerando a descoberta feita por RICKES e cols. (91) e por SMITH (97) de que a vitamina B-12 é um complexo que contem cobalto, constataram por experimentações que não havia uma resposta significante quando cordeiros com carência de cobalto recebiam oral ou parenteralmente vitamina B-12 cristalina em quantidades até 125 microgramas, levando em conta o ganho de peso dos animais e o teôr em hemoglobina.

HALE e cols. (56) tambem verificaram que as injeções de vitamina B-12 cristalina eram insuficiêntes para curar cordeiros com deficiência de cobalto. Dosando por ensáios em pintos verificaram estes autores (57) que o conteúdo do rúmen dos carneiros suplementados com cobalto continha aproximadamente 60 microgramas de vitamina B-12 por 100 gramas de material sêco, e que a produção de vitamina B-12 era limitada no rúmen de carneiros com deficiência de cobalto, quando comparada com a de animais normais. HALE e cols. (58) em trabalho posterior mostram que a vitamina B-12 injetada em cordeiros com deficiência de cobalto na dóse de 100 microgramas diariamente, ou dada oralmente, por um período superior a quatro semanas, não dava resultados satisfatórios, e sugeriram com os dados obtidos, que o papel fisiológico do cobalto no carneiro seria por alguma outra via do que através a vitamina B-12 e que a ação benéfica do cobalto poderia ser devida à produção dos membros das vitaminas do grupo B no rúmen.

Experimentações feitas em carneiros com carência de cobalto, por SMITH e cols. (98), demonstram que a eficiência dos extratos de figado está na vitamina B-12 e que a quantidade minima curativa é de mais ou menos 150 microgramas. Com estes dados os autores esclarecem que as quantidades de vitamina B-12 dadas por BECKER

e cols. (21), por BECKER e SMITH (23, 24) e por HALE e cols. (56, 57, 58), eram insuficientes para curar os animais em estado de carência.

MARSTON e LEE (70) experimentando injeções de vitamina B-12 em carneiros com carência de cobalto, verificaram que tinha as mesmas atividades da administração de cobalto por via oral. MARSTON e SMITH (73) dosando pela *Esch. coli* e pelo *Lactobacillus leichmannii*, as fezes dos animais doentes e tratados com cobalto, constatam que os carneiros com carência de cobalto quando tratados com este elemento aumentavam o teôr em vitamina B-12 nas fezes. Os autores consideram que os ruminantes requerem muito mais vitamina B-12 do que outros animais, e que o síndrome da deficiência de cobalto nos ruminantes é o resultado de um defeito metabolico dando uma profunda deficiência de vitamina B-12.

Verificações são feitas por ANDREWS e ANDERSON (2, 3) de que carneiros com carência de cobalto respondem tão bem à vitamina B-12, quando esta é injetada por via intramuscular numa quantidade de 100 microgramas por semana por carneiro, assim como ao cobalto dado oralmente numa média de 7 miligramas por carneiro por semana.

Dos trabalhos realisados pelos diversos autores que estudaram o assunto ficou esclarecido que os ruminantes requerem uma diéta contendo cobalto e que a ração deficiente deste elemento produz uma anemia que é remediável pelo cobalto dado oralmente, mas não por injeção.

Pelas experimentações e verificações realisadas conclue-se que a importância do cobalto, como mineral indispensável aos ruminantes, está no fato do mesmo agir como elemento biocatalisador dos microrganismos que vivem no rúmen, e ao mesmo tempo fazer parte integrante da molécula da vitamina B-12, conforme evidenciado por HODGKIN e cols. (59) e por BONNETT e cols. (28), considerada fator anti-anemico e de crescimento, e sintetisada no rúmen.

3 — *Estudo clínico da doença no Estado*

A carência de cobalto no Brasil não foi até agora objeto de qualquer trabalho completo de observação ou de experimentação. Apesar da mesma existir entre nós há muitos anos, passou completamente despercebida quanto à sua verdadeira etiologia.

Existe no Estado de São Paulo, conforme já comunicamos em trabalho anterior (37), sob as denominações de "peste de secar", "mal do colete", "sablose", "mal das cabeceiras" e outras denominações regionais, um síndrome com um conjunto de sintomas clínicos em linhas gerais idênticos e que nos pareceu exatamente a mesma

carência de cobalto estudada em diversos países, embora confundida aqui quanto à sua verdadeira etiologia. Vários autores o descrevem como vamos ver. Demonstraremos que esse quadro corresponde exatamente à deficiência de cobalto.

CHALTEIN (33) depois de descrever os sintomas clínicos da "peste de secar, denominação dada há muitos anos pelos nossos criadores, em vista da evolução lenta e progressiva, e aspecto magro dos bovinos e achar que os animais mais receptiveis eram os bovinos de 12 a 18 mêses de idade, e principalmente os da raça zebú, considerou este síndrome como sendo uma caquexia verminótica produzida por dois vermes do genero oesofagostomo.

Discordando do ponto de vista de CHALTEIN, com referência às especies de vermes, VAZ (113) diz que as especies dos generos *Trichostrongylus, Ostertagia* e *Cooperia* deveriam ser responsaveis pela conhecida peste de secar.

Fazendo novas observações sobre a doença, CHALTEIN (34) preconizava aos criadores a construção de bebedouros artificiais e de açudes, a fim de que os animais não se infestassem nos terrenos alagadiços, que deveriam tambem ser cercados e que eram tidos como completamente contaminados por vermes.

Em artigo de divulgação CARVALHO (32) relata em 1932 a constatação de uma doença definhante em bovinos, de evolução lenta e caracterizada por perda do apetite, emagrecimento progressivo, diarréa com estrias de sangue e muco intestinal, pêlo arrepiado, sem brilho natural e com a ponta da cauda desguarnecida de seu revestimento de pêlo, e que quando os animais eram mudados de invernadas, em fase não muito adiantada da doença, saravam completamente. O autor encontrou à necropsia de bovinos doentes, areia no coagulador, em vista do que considerou causa da doença a ingestão involuntária de areia, em consequência das aguadas razas, de fundo arenoso, e não da alimentação. Foi considerada portanto uma "sablose" a causa da doença, denominação que se difundiu pelo interior do Estado, chegando a preconizar-se, como medida de profilaxia, e seguindo a mesma orientação de CHALTEIN, a construção de bebedouros artificiais com decantadores de areia. (Figs. 2 e 3).

O "mal do colete" é uma denominação dada pelos criadores de bovinos da zona do Vale do Paraíba, onde é conhecido há mais de 60 anos, e tambem caracterizado pelos mesmos sintomas clínicos da peste de secar e sablose.

O que caracteriza principalmente o síndrome conhecido entre nós sob os nomes acima enumerados e por nós observado clínica-

mente, é que numa mesma invernada os animais que adoecem são apenas os bovinos; os cavalos, muares e suinos não são atingidos. Os bovinos de inicio perdem o apetite, emagrecem lenta e progressivamente, ficam fracos (Figs. 4, 5 e 6), letárgicos e anemicos, mostrando acentuada palidez das mucosas aparentes, podendo apresentar constipação ou, às vezes, diarréa muito intensa. Apesar das pastagens estarem em bôas condições os bovinos perdem o interesse pela mesma, chegando a pastar muito pouco, e quando em grupos ficam sempre no mesmo lugar nas invernadas, onde raspam todo o solo e começam a comer terra-arenosa; daí a frequênte constatação, às necrópsias, de areia no coagulador. Os animais em fase adiantada da doença começam a comer cascas de arvores (Figs. 7 e 8), principalmente das muito fibrosas, tais como jequitibá (*Couratari estrellensis*, Raddi), jacarandá do campo (*Platypodium elegans*, Vog.) e outras; roem os mourões das cêrcas e dos currais. Os animais novos, de 6 a 18 mêses de idade, são os mais sensiveis; geralmente param de crescer e apresentam a maturidade sexual retardada. Os bezerros recem-nascidos, filhos de vacas doentes, morrem frequêntemente de diarréa dentro de 15 a 20 dias, mais ou menos. Este síndrome tem sido constatado em animais de todas as idades, raças, sexos e evolue para a terminação fatal com todas as características de má nutrição. A produção de leite é sensivelmente diminuida e o mesmo se apresenta com cheiro e gosto sui-generis. As vacas prenhes geralmente podem abortar. A esterilidade é muito frequênte e a natalidade no rebanho é diminuida. Os bovinos da raça zebú e seus mestiços, segundo nossas observações, são muito mais sensíveis do que qualquer outra raça. Quando removidos para outras áreas, consideradas sadias, os animais doentes curam-se completamente.

A "peste de secar" é observada mais frequêntemente em determinada época do ano, de dezembro a maio, ocasião em que as chuvas são mais copiosas, e entrada do inverno, periodo em que os animais mais sofrem e muitos deles perecem no mais completo esgotamento.

Às necrópsias apenas temos constatado lesões referentes à caquexia: distrofia muscular, edema gelatinoso, degeneração gordurosa do fígado, luz do tubo intestinal sensivelmente diminuida, e às vezes pequenas quantidades de areia nos estomagos; muito raramente verificamos a presença de vermes em quantidades que nos induzissem a uma infestação maciça e prejudicial.

As espécies de forragens não apresentam estreita relação com a incidência do síndrome. Assim, temos verificado as mais variadas qualidades de gramineas constituindo as pastagens, tais como o capim colonião ou murumbu (*Panicum maximum*, Jacq., var.?), capim sem-

pre verde (*Panicum maximum*, JACQ., var. *gongylodes*, DOELL), capim jaraguá (*Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf) e outros, nos diversos centros onde graça a doença. O que realmente temos observado em inquéritos clínicos, com relação à incidência da doença, e complementados por análises química das forragens, é que ela é mais frequênte e mais grave no período de intenso crescimento das plantas, época em que o teôr dos elementos minerais diminue sensivelmente.

Verificamos ainda que este síndrome é muito mais frequênte em determinados tipos de solos. Assim, na zona da Noroeste, na da Sorocabana e outras, onde o solo é constituido por finos grãos de areia vermelha, mais permeável, e em parte já esgotados pela agricultura, a incidência da doença é muito mais alta e intensa, e as manifestações clínicas mais acentuadas do que em outras áreas de constituição diferente. No Vale do Paraiba, região de topografia montanhosa, de solos pedregosos, muito erodidos, e de baixa fertilidade, tambem se constáta a doença com bastante frequência. Os tipos de solos, onde a doença tem sido por nós verificada, não apresentam, por conseguinte, a mesma característica quanto à sua constituição geológica.

4 — Técnica de trabalho

Considerando os ultimos trabalhos sobre as várias carências minerais observadas no mundo, julgamos sob o ponto de vista do esclarecimento do síndrome que existe em nosso meio, levar em conta as carências de cobalto, de cobre ou de ambos ao mesmo tempo, e tambem a possibilidade de estarmos diante de um excesso de molibdênio ingerido pelos animais, que poderia estar interferindo no metabolismo do cobre, conforme constatações feitas por FERGUSON e cols. (44, 45), COMAR e cols. (35), DAVIS (40), MARSTON (67) e por CUNNINGHAM e cols. (39).

Pela simples superposição dos sintomas observados no marasmo enzootico e na doença da costa da Austrália, do "bush sickness" da Nova Zelandia, do "salt sick" dos Estados Unidos e do "pining" da Inglaterra, não poderiamos, só com estes elementos clínicos, concluir a qual ou quais carências corresponderia o síndrome existente entre nós; diante deste argumento iniciamos a mesma orientação dos demais pesquisadores estrangeiros, analisando quimicamente o figado de animais doentes ou suspeitos e de são, a fim de, com o teôr dos elementos minerais determinados — cobre e cobalto — tirar as nossas reais conclusões dos dados obtidos destes exames. Seguimos nas nossas determinações e constatações as mesmas técnicas já empregadas em outros países.

A técnica de trabalho nas análises de figado, consistia em colher cêrca de 200 gramas de figado de animais doentes ou suspeitos, em frascos de 300 ml de capacidade, que eram previamente lavados com ácido, a fim de evitar possíveis impurezas, usando-se como conservador o alcool etílico redestilado em aparelho de vidro. No laboratório o figado era cortado em pequenos fragmentos e desidratado em forno a 103 a 105°C durante 24 horas. A determinação dos elementos minerais cobalto e cobre foi feita respectivamente segundo uma adaptação do método dos australianos MARSTON e DEWEY (68) e do de SYLVESTER e LAMPITT (105). Esta adaptação de técnica é usada na Austrália e nos foi gentilmente enviada pelo Dr. H. T. CARROLL (31) — (veja à parte, o rodapé). O método consiste em digerir 10 gramas de figado sêco com ácido sulfúrico, nítrico e perclórico em balão de Kjeldahl. Depois da digestão feita, o digesto é reduzido com ácido sulfuroso e diluido com solução de citrato de amônio, e a solução ajustada para determinado pH, a fim de se extrair por meio de uma solução de difeniltiocarbazona (ditizona) em clorofórmio o cobre a ser determinado à parte. Depois da extração do cobre a solução é novamente ajustada para novo pH e acrescentado alfa-nitroso-beta-naftol para se formar o complexo com o cobalto; este complexo, alfa-nitroso-beta-naftol-cobalto é em seguida extraído da solução com clorofórmio puro; os extratos são reunidos, o clorofórmio evaporado e o resíduo destruido por meio de digestão úmida com ácido sulfúrico e perclórico; o digesto é diluido com agua redestilada e o pH ajustado com amonia; acrescenta-se buffer de pH 7.2 e em seguida adiciona-se solução de nitroso-R-sal para se formar o respectivo complexo com o cobalto que é de côr vermelho brilhante; o complexo é fixado pela nitratação e os demais formados com o nitroso-R-sal são descorados com água de bromo. A solução é completada com agua redestilada para o volume de 10 ml e a concentração do cobalto é estimada segundo uma curva padrão construida com 1, 2, 3 e 4 microgramas de cobalto por 10 ml, e preparada com a mesma técnica. Usamos em nossas determinações o espectrofótometro Coleman Junior, Modelo 6-A, e cubas de 19 x 109 mm; as leituras foram feitas em ondas de 420 milimicrons e lidas em densidade ótica. Da construção da curva padrão de cobalto temos obtido o valor de K (K = Concentração/Densidade) igual a 17.35 ± 0.04.

Para a determinação do cobre adotamos o método de SYLVESTER e LAMPITT (105). Uma vez feita a extração do cobre com a solução de ditizona, os extratos são reunidos em balão de Kjeldahl de 100 ml. O clorofórmio é evaporado e o resíduo digerido com ácido sulfúrico e perclórico. O digesto é diluido com água redestilada e colocado em balão aferido de 50 ml. E' retirada uma alíquota em tubo de ensaio, acrescentando-se citrato de amônio e, alcalinisada com amonia, é adicionada uma solução de dietilditiocarbamato de sódio, reativo para desenvolver a côr com o cobre, e a solução finalmente completada para o volume de 10 ml. A determinação do cobre é feita tambem de acôrdo com uma curva padrão construida com 5, 10, 15 e 20 microgramas de cobre por 10 ml, com a mesma técnica, e a leitura feita no espectofótometro Coleman Junior, conforme a determinação do cobalto, variando apenas o comprimento de onda que é de 440 milimicrons.

5 — *Experiências realizadas*

a) — *Análises de figados*

Foram feitas análises química quantitativas do teôr de cobalto e cobre no figado de bovinos sadios e, comparativamente, análises identicas de figado de bovinos doentes ou suspeitos. Os índices obtidos nos dois casos mostram diferenças acentuadas no teôr em cobalto. Essas diferenças correspondem em linhas gerais às que têm sido assinaladas por ASKEW e DIXON (6, 7), ASKEW (4), DIXON e KIDSON (43, 44), UNDERWOOD e HARVEY (112), UNDERWOOD e BECK (110), ASKEW e WATSON (10), MCNAUGHT (78), BOWSTEAD e cols. (29, 30), RUSSELL (94) e outros, os quais concluiram de suas determinações que os animais com carência de cobalto apresentavam no figado um teôr deste elemento inferior a 0.080 p.p.m. sobre a matéria sêca, em comparação com os normais que tinham média superior a 0.100 p.p.m. sobre a matéria sêca.

A tabela 1 fornece os índices sobre o número de analises realizadas em figado de bovinos normais e doentes, assim como indica o teôr de cobalto e cobre nos dois casos. Pode-se verificar claramente a deficiência de cobalto nos animais doentes. O teôr de cobre encontrado no figado de ambos os lotes corresponde aos limites normais dados por CUNNINGHAM (38), MOORE (81), BENNETTS e cols. (26), MCNAUGHT (78), UNDERWOOD e BECK (110) e outros.

TABELA 1

Teôr de cobalto e cobre encontrado no fígado de bovinos sadios e doentes. Cobalto e cobre expressos em p.p.m. sobre a matéria sêca (+)

BOVINOS SADIOS				BOVINOS DOENTES		
N.º	Cobalto	Cobre		N.º	Cobalto	Cobre
1	0.113	139.2		1	0.026	110.0
2	0.113	241.6		2	0.026	117.0
3	0.120	266.5		3	0.029	155.3
4	0.126	109.0		4	0.038	508.2
5	0.126	118.2		5	0.040	71.2
6	0.127	295.0		6	0.040	198.0
7	0.143	427.0		7	0.056	358.0
8	0.145	144.9		8	0.060	198.9
9	0.150	420.3		9	0.063	163.3
10	0.172	373.2		10	0.065	180.0
11	0.174	148.0		11	0.065	180.6
12	0.193	157.9		12	0.069	144.5
13	0.200	304.4		13	0.075	223.0
14	0.202	199.0		14	0.079	240.0
15	0.263	243.0		15	0.080	136.5
16	0.267	60.0		16	0.087	105.8
17	0.268	73.2		17	0.089	163.9
18	0.270	125.4		18	0.090	86.1
19	0.289	152.1		19	0.090	196.0
20	0.314	97.8		20	0.100	315.5
21	0.326	213.0				
22	0.328	52.6				
Médias	0.201 ± 0.016	198.24 ± 23.72	(*)	Médias	0.058 ± 0.006	175.08 ± 24.07

(*) — O número precedido de ± é o erro padrão da média.

(+) — De acôrdo com os diversos autores que estudaram o assunto, os índices para cobalto e cobre no fígado dos bovinos normais e com carência desses microelementos são os seguintes:

(valores expressos em p.p.m. sobre a matéria sêca)

Cobalto — Normal > 0.100 — Carência < 0.080
Cobre — Normal > 100. — Carência < 50.

b) — *Análises de forragens*

As forragens das áreas consideradas doentes, nos diversos países, foram analisadas por ASKEW e DIXON (6, 7), ASKEW e MAUNSELL (9), MCNAUGHT (76, 77), HORPKIRK e GRIMMET (61), BONNER, MCNAUGHT e PAUL (27), UNDERWOOD e HARVEY (112), ASKEW (4), CORNER e SMITH (36), PATTERSON (88), RUSOFF e cols. (95), KILHAM (64) e muitos outros, e verificaram de um modo geral que os animais adoeciam em invernadas cujas forragens apresentavam um teôr de

cobalto inferior a 0.070 p.p.m. sobre a matéria sêca. Demonstraram ainda estes autores que a concentração de cobalto nas forragens era aumentada e, por conseguinte satisfatória para a saúde e o bom desenvolvimento dos animais, quando havia uma adubação ou pulverisação do solo com sais de cobalto.

Temos verificado em nossas determinações que nas áreas onde existe o síndrome conhecido vulgarmente pelos nomes de "peste de secar", "sablose" e "mal do colete", e confirmado nas análises de figado dos animais doentes pelo seu baixo teôr em cobalto, que as forragens consumidas pelo gado doente, e consistindo principalmente de capim colonião, capim sempre verde, capim catingueiro roxo e outros, possuem o teôr de cobalto inferior aos acima enumerados pelos diversos autores estrangeiros que estudaram o assunto. O teôr de cobre encontrado nas forragens está dentro dos limites normais. Análises idênticas foram realizadas com forragens onde não ocorria a doença, e os índices obtidos revelam diferenças bem acentuadas nos dois casos, com relação ao teôr em cobalto, conforme mostra a tabela 2.

TABELA 2

Teôr de cobalto e cobre encontrado nas forragens de lugares sadios e doentes. Cobalto e cobre expressos em p.p.m. sobre a matéria sêca (+)

LUGARES SADIOS				LUGARES DOENTES		
N.º	Cobalto	Cobre		N.º	Cobalto	Cobre
1	0.119	10.1		1	0.026	10.4
2	0.236	12.0		2	0.029	10.7
3	0.284	16.0		3	0.031	10.4
4	0.351	21.0		4	0.041	27.3
5	0.365	12.4		5	0.045	10.2
6	0.381	13.3		6	0.054	24.0
7	0.381	16.2		7	0.059	8.8
8	0.392	12.4		8	0.060	12.5
9	0.415	15.1		9	0.071	13.8
10	0.420	15.1				
Médias	0.334 ± 0.030	14.36 ± 0.96	(*)	Médias	0.046 ± 0.005	14.23 ± 2.23

(*) — O número precedido de ± é o erro padrão da média.

(+) — De acôrdo com os diversos autores que estudaram o assunto, os índices para cobalto e cobre nas forragens de lugares sadios e doentes são os seguintes:

(valores expressos em p.p.m. sobre a matéria sêca)

Cobalto — Normal > 0.080 — Carência < 0.060

Cobre — Normal > 5. — Carência < 3.

c) — *Análises de solos*

As mesmas verificações foram realizadas com relação ao teôr de cobalto no solo por McNAUGHT (75), KIDSON (62, 63), STANTON e KIDSON (99), UNDERWOOD e HARVEY (112), CORNER e SMITH (36), PATTERSON (88, 89), STEWART e cols. (102) e outros, os quais verificaram que os animais adoeciam geralmente em solos cuja concentração de cobalto era inferior a 2 p.p.m. sobre a matéria sêca.

As análises de solos que tivemos ocasião de fazer e provenientes de áreas por nós consideradas doentes, em vista dos exames de fígado de bovinos doentes e das forragens crescidas nessas áreas, como a da zona da Noroeste, da Sorocabana e do Vale do Paraíba, revelam que a concentração de cobalto nesses solos tem sido inferior a 2 p.p.m. sobre a matéria sêca, ao passo que as análises de terras de outras áreas, não doentes, revelam índices muito superiores conforme mostra a tabela 3.

TABELA 3

Têor de cobalto e cobre encontrado em solos de lugares sadios e doentes. Cobalto e cobre expressos em p.p.m. sobre a matéria sêca (+)

LUGARES SADIOS				LUGARES DOENTES		
N.º	Cobalto	Cobre		N.º	Cobalto	Cobre
1	10.0	16.8		1	0.164	15.6
2	13.3	17.8		2	0.328	16.3
3	15.0	33.7		3	0.471	16.8
4	18.2	34.4		4	0.784	22.5
5	25.0	18.2		5	1.355	18.7
6	30.3	21.7		6	1.680	19.6
7	30.8	16.8				
Médias	20.37 ± 3.16	22.77 ± 2.98	(*)	Médias	0,797 ± 0,246	18.25 ± 1.05

(*) — O número precedido de ± é o erro padrão da média.

(+) — De acôrdo com os diversos autores que estudaram o assunto, os índices para cobalto nos solos de áreas sadias e doentes são os seguintes:

(valores expressos em p.p.m. sobre a matéria sêca)

Cobalto — Normal > 2 — Carência < 2

6 — *O cobalto como fator de correção da doença*

Antes de fazermos nossas constatações quanto a verdadeira etiologia da peste de secar, da sablose e do mal do colete, como sendo uma carência de cobalto, os criadores e invernistas do Estado de São Paulo usavam como medida de profilaxia e como tratamento

curativo, os mais variados métodos aconselhados pelos técnicos da época, como a construção de açudes, bebedouros especiais de alvenaria e cerco de baixadas arenosas ou alagadiças, tão preconizadas por CHALTEIN (33, 34) e CARVALHO (32), e uso de formulas de elementos minerais, principalmente daquelas consistindo de sulfato ferroso, sulfato de cobre e farinha de osso; vermífugos, como o sulfato de cobre e a fenotiazina, foram largamente usados. Todas medidas preventivas e curativas foram sempre sem resultados satisfatórios, pois, os animais inicialmente apresentavam ligeira melhoria, porem logo em seguida caíam no mais completo definhamento, sobrevindo a morte por esgotamento e marasmo. Por outro lado os vermífugos e elementos minerais, ferro e cobre, nunca chegaram a resolver os problemas dêste síndrome.

Nas nossas experimentações temos verificado que com a administração de um miligrama de cobalto por cabeça e por dia, nas propriedades onde a doença grassa há muitos anos, os bovinos doentes se recuperam completamente. Além disso, há de se notar, que ao mesmo tempo deixam de surgir novos casos da doença no rebanho. As nossas observações em varias propriedades onde este síndrome era comum vão para mais de três anos, e o estado geral dos animais tem sido dos mais satisfatórios. (Figs. 9 e 10).

O método de administrar o cobalto aos bovinos, como medida de profilaxia e mesmo como tratamento curativo, tem sido aquele de dissolver o sulfato de cobalto comercial nagua, e em seguida a solução pulverizada ou regada sobre o sal comum, a fim de se obter uma uniforme distribuição do cobalto no sal, na proporção de 0.05 por cento (Figs. 11 e 12). O sal assim preparado é administrado aos bovinos à vontade, colocando-o em côchos nas invernadas. Os animais, inicialmente, onde a carência deste mineral tem sido verificada, são ávidos pelo sal cobaltisado, chegando mesmo a consumir até quasi o triplo da quantidade normal que se consome por cabeça, indo, entretanto, paulatinamente, diminuindo o consumo de acôrdo com suas necessidades.

Com a administração do cobalto aos bovinos em áreas onde a doença grassa, temos observado que os animais doentes recuperam-se rapidamente, pois de pronto o apetite é restabelecido, o peso do animal aumenta gradativamente, o pêlo torna-se liso e brilhante, a produção de leite é normalisada, a fertilidade e a natalidade no rebanho são aumentadas. Os ruminantes deixam de comer cascas de arvores e terra, e os bezerros recem-nascidos não apresentam mais aquela diarréa em consequência da carência de cobalto das vacas. A melhoria dos animais doentes, quando suplementados com cobalto na ali-

mentação, é notada dentro de pouco tempo, de 20 a 40 dias e a cura geralmente é completa.

Com esta prática de administrar o sal comum cobaltisado aos bovinos, temos obtido os melhores resultados na profilaxia e no tratamento da "peste de secar", "sablose" e "mal do colete".

7 — *Distribuição geográfica da carência de cobalto em bovinos no Estado de São Paulo*

Por inquérito clínico levado a efeito no interior do Estado de São Paulo e complementado pelos exames químicos de fígados de bovinos doentes e suspeitos, de forragens e de solos das áreas atingidas, verificamos que a carência de cobalto nestes animais é encontrada com bastante frequência em várias regiões; na zona da Noroéste, na Sorocabana, na Paulista e no Vale do Paraiba.

Todas as áreas onde tivemos ocasião de constatar esta carência, correspondem àquelas que são destinadas quasi unicamente às criações e engordas de animais extensivamente, constituindo de um modo geral de terras improprias para a agricultura.

Observamos que a incidência da doença tem sido mais grave em determinadas regiões e parece-nos que sua intensidade está aumentando gradativamente com o decorrer do tempo.

Apresentamos o mapa do Estado de São Paulo (Fig. 1) onde assinalamos as zonas atingidas e até presentemente por nós verificadas. Provavelmente muitas outras áreas ainda serão delimitadas.

8 — *Discussão*

Existe no interior do Estado de São Paulo um síndrome conhecido vulgarmente pelos nomes de "peste de secar", "sablose", "mal de areia", "mal das cabeceiras", "mal do colete" e outras denominações, caracterizado por perda do apetite, emagrecimento lento e progressivo, caquexia, letárgia, alotriofagia, anemia, pêlo crescido, áspero e arrepiado, diminuição da produção de leite, da fertilidade e da natalidade, em fim, todos os sintomas consequêntes de má nutrição.

Este síndrome que existe em nosso meio há muitos anos foi anteriormente confundido quanto à sua verdadeira etiologia pelos técnicos da época. Pela suposição inicial, aventada em 1930, a doença era considerada como uma caquexia verminótica e, posteriormente, em 1932, considerada uma "sablose". As verminoses e a ingestão involuntária de areia anteriormente apontadas como causas desta doença, o foram em ocasião em que nada se conhecia ainda sobre a

importância dos microelementos na alimentação, e especialmente do cobalto para os ruminantes. Tambem em outros países estes dois fatores foram por muito tempo responsabilizados como agentes etiologicos de doenças definhantes e caquéticas, até que se revelou a essencialidade dos elementos minerais menores para os animais.

Na Nova Zelandia, na Austrália, nos Estados Unidos, na Inglaterra e em Kenia, o quadro clínico descrito pelos diversos autores que estudaram carências minerais em ruminantes, se superpunha em linhas gerais, ao que aqui se verifica e havia pois, interêsse em examinar com a mesma norma a doença aqui constatada.

A doença de quadro clínico semelhante ao que é descrito naqueles países, pode ser encontrada com bastante frequência em várias regiões do Estado de São Paulo, na zona da Noroéste, na Sorocabana, na Paulista e no Vale do Paraíba. Ela ocorre com maior frequência em determinada época do ano, de dezembro a maio, quando os bovinos são atingidos em maior numero, com sintomas mais graves e quando muitos deles perecem no mais completo definhamento.

Pela simples superposição dos sintomas observados nos síndromes definhantes da Austrália, da Nova Zelandia, dos Estados Unidos ou da Inglaterra, não poderiamos concluir a qual ou às quais carências minerais corresponderia a doença existente entre nós; daí procurarmos determinar por análises química os teôres dos elementos cobalto e cobre no fígado de bovinos sadios e doentes, de forragens e de solos de áreas consideradas sadias e doentes, a fim de esclarecermos, por meio das análises, a existência no país destes tipos de carências minerais.

Conforme mostra a tabela 1 foram feitas determinações química dos teôres de cobalto e cobre no figado de 22 bovinos sadios e de 20 doentes. Os índices obtidos revelam diferenças nítidas e acentuadas nos dois casos, com referência ao teôr de cobalto. Essas diferenças correspondem às que são assinaladas pelos diversos autores que estudaram o problema em outras regiões. Nos animais normais, os teôres de cobalto e cobre apresentam uma média respectivamente de 0.201 ± 0.016 e de 198.24 ± 23.72 p.p.m. sobre a matéria sêca. Nos bovinos doentes os valores de cobalto e cobre apresentam respectivamente uma média de 0.058 ± 0.006 e de 175.08 ± 24.07 p.p.m. sobre a matéria sêca. Sob o ponto de vista estatístico verificamos uma diferença bem significativa com relação ao elemento cobalto, ao passo que com relação ao cobre esta diferença não é significativa, sendo os teôres perfeitamente normais.

As forragens analisadas, consistindo principalmente de capim colonião *(Panicum maximum, Jacq. var.?)* capim sempre verde *(Panicum maximum, Jacq. var. gongylodes, Doell)*, capim catingueiro roxo *(Melinis multiflora, Pal. de Beauv.)* e outros, das áreas consideradas sadias, conforme tabela 2, apresentam os teôres de cobalto e cobre respectivamente uma média de 0.334 ± 0.030 e de 14.36 ± 0.96 p.p.m. sobre a matéria sêca, revelando diferenças acentuadas com aquelas das regiões doentes, cujos teôres de cobalto e cobre apresentam respectivamente uma média de 0.046 ± 0.005 e de 14.23 ± 2.23 p.p.m. sobre a matéria sêca.

Os teôres destes elementos minerais essenciais aos bovinos nos solos de áreas sadias e doentes tambem revelam diferenças nítidas, como mostra a tabela 3, pois encontramos os valores médios de cobalto e cobre respectivamente de 20.37 ± 3.16 e de 22.77 ± 2.98 p.p.m. sobre a matéria sêca, para os lugares sadios, e de 0.797 ± 0.246 e de 18.25 ± 1.05 p.p.m. para os lugares considerados doentes.

As tabelas 1, 2 e 3 mostram os resultados dos exames de figados, de forragens e de solos, os quais sempre evidenciam o baixo teôr de cobalto encontrado nos doentes, em comparação com os normais. Estes dados mostram que a carência de cobalto observada nos bovinos doentes resulta da deficiência deste elemento nas forragens em consequência da pobreza do mesmo no solo.

Temos observado que os bovinos da raça zebú (Bós indicus) são mais exigentes quanto ao cobalto em comparação com os de raça européa (Bós taurus), pois nas forragens onde encontramos o valor de cobalto igual a 0.080 p.p.m. sobre a matéria sêca, os zebús já apresentam todos os sintomas de carência, ao passo que os bovinos de raça européa só mostram sintomas tipicos quando o teôr de cobalto é igual ou inferior a 0.050 p.p.m.

Nas nossas experimentações que vão por um periodo superior a três anos, temos obtido os melhores resultados na profilaxia e no tratamento, nas áreas onde grassa a "peste de secar", "mal do colete" e "sablose", com a administração de 1 a 2 miligramas de cobalto por cabeça e por dia.

9 — *Conclusões*

O síndrome conhecido no interior do Estado de São Paulo pelas denominações vulgares de "peste de secar", "mal do colete", "sablose", "mal das cabeceiras" e por outros nomes regionais, apresentando o mesmo quadro clínico da carência de cobalto em bovinos, como o descrito em outros países, é por nós estudado neste trabalho.

Concluimos pelos resultados dos exames químicos comparativos de figados de bovinos sadios e de doentes, de forragens e de solos de lugares considerados sadios e doentes, e tambem pelos sucessos obtidos com a administração de cobalto na profilaxia e no tratamento da doença, que este síndrome se trata de carência de cobalto idêntica ao "bush sickness" da Nova Zelandia e ao "marasmo enzootico" da Austrália.

Ao Dr. H. T. Carroll, Membro da F A O, os nossos agradecimentos por ter-nos enviado a técnica de dosagem de cobalto e cobre que se usa na Austrália.

COBALT DEFICIENCY IN BOVINES

Abstract

In the interior of the State of São Paulo a syndrome is commonly found among bovines which consists of loss of appetite, lethargy, cachexia, anemia and other signs of malnutrition. This syndrome, popularly referred to by the names as "peste de secar", "mal de colete", "sablose" and others, is clinically identical with the enzootic marasmus in Australia and bush sickness in New Zealand. It is more frequently seen in the rainy season, from December to May, when more bovines are attacked and the symptoms of the disease are stronger.

Chemical tests were performed to assess the cobalt and copper levels in the livers of healthy and sick animals as well as in fodder and soils from regions whence these animals came.

The results show sharp differences regarding the cobalt level. Table I refers to the levels of cobalt and cooper in the livers of 22 healthy and 20 sick bovines. In the normal animals the average values of cobalt and copper are, respectively, 0.201 ± 0.016 and 198.24 ± 23.72 p.p.m. of dry matter. In the sick animals the average values are 0.058 ± 0.006 and 175.00 ± 24.07 p.p.m. for cobalt and copper, respectively.

Table 2 shows the levels of cobalt and copper in the fodder, mainly grasses, on which the animals fed. In forage from healthy pastures the average levels of cobalt and copper were 0.334 ± 0.030 and 14.36 ± 0.96 p.p.m. of dry matter, respectively, while in the one from "sick regions" the averages for the same elements were 0.046 ± 0.005 and 14.23 ± 2.23.

Table 3 shows average value of 20.37 ± 3.16 and 22.77 ± 2.98 p.p.m. of dry matter for cobalt and copper, respectively, in the soil of healthy regions and of 0.797 ± 0.246 and 18.25 ± 1.05 p.p.m. in the soil of regions where the disease is prevalent.

Bovines of the species Bos indicus show a greater dependency on cobalt than the ones of the species Bos Taurus, since the former present all the symptoms of the disease when fed on forage which contains 0.080 p.p.m. of cobalt, while the last only shows signs of disease when the level of cobalt drops to or below 0.050 p.p.m.

In our experiments, which cover a period of three years, very good results have been obtained in the prophylaxis and treatment of the condition by daily feeding 1 to 2 mg of cobalt to each animal in the regions where the diseases prevails.

BIBLIOGRAFIA

1 — Abelson, P. H. & H. H. Darby — 1949 — The Synthesis of Vitamin B 12 in the Digestiv System of the Sheep. *Science*, **110**: 566.

2 — Anderson, J. P. & E. D. Andrews — 1952 — Response to Vitamin B 12 of Grazing-Cobalt-Deficient Lambs. *Nature*, **170**: 807.

3 — Andrews, E. D. & J. P. Anderson — 1954 — Responses of Cobalt Deficient Lambs to Cobalt and to Vitamin B 12. *N. Z. J. Sci. Technol.*, **35**: 483-488.

4 — Askew, H. O. — 1939 — Cobalt Deficiency at Glenhope, Nelson, New Zealand. *N. Z. J. Sci. Technol.*, 20-A: 302-309.

5 — Askew, H. O. & J. K. Dixon — 1936 — Importance of Cobalt in the Treatment of Certain Stock Ailments in the South Island, New Zealand. *N. Z. J. Sci. Technol.*, **18**: 73-92.

6 — Askew, H. O. & J. K. Dixon — 1937 — Cobalt status of animal organs from South Island (N. Z.) drench experiments. *N. Z. J. Sci. Technol.*, **18**: 707-716.

7 — Askew, H. O. & J. K. Dixon — 1937 — The Value of Cobalt Salts for Pasture Top-Dressing in the Treatment of Stock Ailment at Glenhope, Nelson, and Morton Mains, Southland. *N. Z. J. Sci. Tecnol.*, **19**: 317-325.

8 — Askew, H. O. & J. K. Dixon — 1938 — Value of Cobalt for Pasture Top-Dressing in Treatment of Stock Ailment at Glenhope, Nelson, and Morton Mains, Southland. *N. Z. J. Sci. Technol.*, **20**: 317-329.

9 — Askew, H. O. & P. W. Maunsell — 1937 — The Cobalt Content of Some Nelson Pastures. *N. Z. J. Sci. Technol.*, **19**: 337-342.

10 — Askew, H. O. & T. Rigg — 1932 — Occurrence of bush-sickness at Glenhope, Nelson, New Zealand. *N. Z. J. Dept. Sci. Ind. Res., Bull.* N.º 32, pp. 5-20.

11 — Askew, H. O. & J. Watson — 1943 — Correlation of Cobalt Content of Organs of Healthy and Bush-Sick Sheep at Glenhope, New Zealand. *N. Z. J. Sci. Technol., 25-A*: 81-85.

12 — Aston, B. C. — 1924 — Bush-Sickness Investigation. Five Years' Work at the Mamaku Demonstration Farm. *N. Z. J. Agric.*, 28: 215-238.

13 — Aston, B. C. — 1924 — The Bush Sickness Investigation. Laboratory Work and Results. *N. Z. J. Agric.*, **28**: 301-305 e 381-390.

14 — Aston, B. C. — 1924 — The Bush Sickness Investigation. Laboratory Work and Results. *N. Z. J. Agric.*, **29**: 14-17 e 84-90.

15 — Aston, B. C. — 1928 — Iron-Starvation (Bush-Sickness) in Stock. *N. Z. J. Agric.*, **36**: 316-318.

16 — Aston, B. C. — 1930 — Bush-Sickness Investigation. Notes on Some Recent Results. *N. Z. J. Agric.*, **41**: 419-422.

17 — Aston, B. C. — 1931 — Feeding of Iron in Bush Sickness. Some Recent Work with Sheep. *N. Z. J. Agric.*, **42**: 369-376.

18 — Aston, B. C. — 1931 — Feeding of Iron in Bush Sickness. Some Further Results and Directions. *N. Z. J. Agric.*, **43**: 11-13.

19 — Aston, B. C. — 1932 — Iron Licks for Bush-Sickness. Further Experiences with Sheep and Cattle. *N. Z. J. Agric.*, **44**: 171-176.

20 — Aston, B. C. — 1932 — Control of Bush-Sickness in Sheep. The Atiamuri Experiment with Iron Licks. *N. Z. J. Agric.*, **44**: 367-378.

21 — Becker, D. E., S. E. Smith & J. K. Loosli — 1949 — Vitamin B 12 and Cobalt Deficiency in Sheep. *Science*, **110**: 71-72.

22 — Becker, R. B. & L. W. Gaddum — 1937 — The Composition of Limonites Effective and Ineffective in Correcting Bush-Sickness in Cattle. *J. Dairy Sci.* **20**: 737-739.

23 — Becker, D. E. & S. Smith — 1949 — The Metabolism of Cobalt in Lambs. *J. Anim. Sci.*, 8: 615 (Abstract).

24 — Becker, D. E. & S. E. Smith — 1951 — The Metabolism of Cobalt in Lambs. *J. Nutrition*, **43**: 87-100.

25 — Becker, R. B., W. M. Neal & A. L. Shealy — 1931 — I. Salt Sick: Its cause and prevention. II. Mineral supplements for cattle. *Univ. Florida Agric. Exp. Stat., Bull.* N.º 231, 13 figs.

26 — Bennetts, H. W., A. B. Beck, R. Harley & S. T. Evans — 1941 — "Falling Disease" of Cattle in the South-West of Western Australia. 2. Studies of Copper Deficiency in Cattle. *Austral. Vet. J.*, **17**: 85-93.

27 — Bonner, W. G., K. J. McNaught & G. W. Paul — 1939 — Cobalt Top-dressing Experiments. Excellent Results in the King Country. *N. Z. J. Agric.*, **58**: 493-494.

28 — Bonnett, R., J. R. Cannon, A. W. Johnson, I. Sutherland, A. R. Todd & E. L. Smith — 1955 — The Structure of Vitamin B 12 and its Hexacarboxylic Acid Degradation Product. *Nature*, **176**: 328-330.

29 — Bowstead, J. E., J. P. Sackville & R. D. Sinclair — 1942 — The Development of Deficiency in Sheep. *Sci. Agric.*, **22**: 314-325.

30 — Bowstead, J. E., J. P. Sackville & R. D. Sinclair — 1942 — Efficacy of Cobaltized Salt for the Prevention of Cobalt Deficiency Symptoms in Sheep. *Sci. Agric.*, **22**: 479-481.

31 — Carroll, H. T. — Comunicação pessoal.

32 — Carvalho, G. T. — 1933 — A doença dos bebedouros (Sablose dos francezes). *Rev. Ind. Anim.*, n.º **10**: 1.148-1.150.

33 — Chaltein, F. — 1930 — Cachexia verminose dos bovinos. *Rev. Ind. Anim.*, N.º **6**: 663-673.

34 — Chaltein, F. — 1932 — As aguadas e a caquexia verminosa dos bovinos. *Rev. Ind. Anim.*, N.º **8**: 936-940.

35 — Comar, C. L., L. Singer & G. K. Davis — 1949 — Molybdenum metabolism and interrlationships with copper and phosphoros. *J. Biol. Chem.*, **180**: 913-922.

36 — Corner, H. H. & A. M. Smith — 1938 — The Influence of Cobalt on Pine Disease in Sheep. *Biochem. J.*, **32**: 1.800-1.805.

37 — Corrêa, R. — 1955 — Carência de Cobalto em Bovinos no Estado de São Paulo. *Rev. Bras. Biol.*, **15**: 309-313.

38 — Cunningham, H. M., J. M. Brown & A. E. Edie — 1953 — Molybdenum Poisoning of Cattle in the Shaw River Valley of Manitoba. *Canad. J. Agric. Sci.*, **33**: 254-260.

39 — Cunningham, I. J. — 1931 — Some Biochemical and Physiological Aspects of Copper in Animal Nutrition. *Biochem. J.*, **25**: 1.267-1.294.

40 — Davis, G. K. — 1951 — Trace Elements in the Nutrition of Cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **119**: 450-451.

41 — Denham, H. G. — 1937 — Cobalt Investigation in New Zealand. *Science*, **85**: 383.

42 — Dixon, J. K. & E. B. Kidson — 1940 — The Influence of Southland Limestones on the Cobalt Content Pasture at Morton Mains. *N. Z. J. Sci. Technol., 22-A*: 1-6.

43 — Dixon, K. & E. B. Kidson — 1941 — The Effect of a Heavy Dressing of Southland Limestones on the Health of Lambs at Morton Mains. *N. Z. J. Sci. Technol., 23-A*: 47-50.

44 — Ferguson, W. S., A. H. Lewis & S. J. Watson — 1943 — Action of Molybdenum in Nutrition of Milking Cattle. *Nature*, **141**: 553.

45 — Ferguson, W. S., A. H. Lewis & S. J. Watson — 1943 — The Teart Pasture of Somerset. I. The Cause and Cure of Teartness. *J. Agric. Sci.*, **33**: 44-51.

46 — Filmer, J. F. — 1933 — Enzootic Marasmus of Cattle and Shepp. Preliminary Report Having Special Reference to Iron and Liver Therapy. *Austral. Vet. J.*, **9**: 163-179.

47 — Filmer, J. F. — 1941 — Cobalt Deficiency in Sheep. Is Monthly Drenching Effective? *N. Z. J. Agrc.*, **63**: 287-290.

48 — Filmer, J. F. & E. J. Underwood — 1934 — Enzootic Marasmus Treatment with Limonite Fractions. *Austral. Vet. J.*, **10**: 83-87.

49 — Filmer, J. F. & J. Underwood — 1937 — Enzootic Marasmus. Further Data Concerning the Potency of Cobalt as a Curative and Prophylatic Agent. *Austral. Vet. J.*, **13**: 57-64.

50 — Gall, L. S., W. Burroughs, P. Gerlaugh & B. H. Edginton — 1948 — Special Methods for Rumen Bacterial Studies in the Field. *J. Anim. Sci.*, **8**: 433-440.

51 — Gall, L. S., W. Burroughs, P. Gerlaugh & B. H. Edginton — 1948 — Rumen Bacteria in Cattle and Sheep on Pratical Farm Rations. *J. Anim. Sci.*, **8**: 441-449.

52 — Gall, L. S., S. E. Smith, D. E. Becker, C. N. Stark & J. K. Loosli — 1949 —Rumen Bacteria in Cobalt-Deficient Sheep. *Science*, **109**: 468-460.

53 — Gall, L. S. & C. N. Huhtanen — 1950 — Criteria for Considering a Bacterium from the Rumen As a Bona Fide Rumen Organism. *J. Anim. Sci.*, **9**: 656 (Abstract).

54 — Gortner, R. A. — 1937 — Cobalt — An essential element. *Science*, **85**: 382-383.

55 — Greig, J. R., H. Dryerre, W. Godden, A. Crichton & W. G. Ogg — 1933 — "Pine — A Disease Affecting Sheep and Young Cattle". *Vet. J.* **89**: 99-110.

56 — Hale, W. H., A. L. Pope, P. H. Phillips & G. Bohstedt — 1948 — The Effect of Cobalt on Vitamin B 12 Synthesis in the Rumen of Sheep. *J. Anim. Sci.*, **8**: 621 (Abstract).

57 — Hale, W. H., A. L. Pope, P. H. Phillips & G. Bohstedt — 1950 — The Effect of Cobalt on the Synthesis of Vitamin B 12 in the Rumen of Sheep. *J. Anim. Sci.*, **9**: 414-419.

58 — Hale, W. H., A. L. Pope, P. H. Phillips & G. Bohstedt — 1950 — The B-Vitamin in Relation to a Cobalt Deficiency in Sheep. *J. Anim. Sci.*, **9**: 484-490.

59 — Hodgkin, D. C., J. Pickworth, J. H. Robertson, K. N. Trueblood, R. J. Prosen & J. G. White — 1955 — Structure of Vitamin B 12. The Crystal Structure of the Hexacarboxylic acid, Derived from B 12 and the Molecular Structure of the Vitamin. *Nature*, **176**: 325-328.

60 — Hopkirk, C. S. M. — 1937 — Cobalt-Feeding Experiment at Arohena. *N. Z. J. Agric.*, **54**: 344-349.

61 — Hopkirk, C. S. M. & R. E. R. Grimmet — 1938 — Importance of Cobalt. Relationship to the Health of Farm Animals. *N. Z. J. Agric.*, **65**: 21-24.

62 — Kidson, E. B. — 1937 — Cobalt Status of New Zealand Soils. *N. Z. J. Sci. Technol.*, **18**: 694-707.

63 — Kidson, E. B. — 1938 — Some Factors Influencing the Cobalt Contests of Soils. *J. Soc. Chem. Ind.*, **57**: 95-96.

64 — Kilham, B. J. — 1941 — Cobalt Deficiency in Some Michigan Cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **99**: 279-282.

65 — Lines, E. W. — 1935 — The Effect of the Ingestion of Minute Quantities of Cobalt by Sheep Affected with "Coast Disease": A Preliminary Note. *J. Counc. Scient. Ind. Res.*, **8**: 117-119.

66 — Marston, H. R. — 1935 — Problems Associated with "Coast Disease" in Plant and Animal Tissues. *Austral. J. Exp. Biol.*, **18**: 343-352.

67 — Marston, H. R. — 1952 — Cobalt, Copper and Molybdenum in the Nutrition of Animals and Plants. *Physiol. Rev.*, **32**: 66-121.

68 — Marston, H. R. & D. W. Dewey — 1940 — The Estimation of Cobalt in Plant and Animal Tissues. *Austral. J. Exp. Biol.*, **18**: 343-352.

69 — Marston, H. R., E. W. Lines, R. G. Thomas & I. W. McDonald — 1938 — Cobalt and Copper in Ruminant Nutrition. *Nature*, **141**: 398-400.

70 — Marston, H. R. & H. J. Lee — 1952 — Cobalt in the Nutrition of Ruminants. Response of Cobalt-Deficient Sheep to Massive Doses of Vitamin B 12. *Nature*, **170**: 791.

71 — Marston, H. R., R. G. Thomas, D. Murnane, E. W. Lines, I. W. McDonald, H. O. Moore, & L. B. Bull — 1938 — Studies on Coast Disease of Sheep in South Australia. *Commonwealth Austral. Counc. Sci. Ind. Res., Bull.* N.º 113, 3 figs.

72 — Marston, H. R. & I. W. McDonald — 1938 — Studies on Coast Disease of Sheep in Sout Australia. *Commonwealth Austral. Counc. Ind. Res., Bull.* N.º 113, pp. 72-78 e 79-85.

73 — Marston, H. R. & R. M. Smith — 1952 — Cobalt in the Nutrition of Ruminants. Control of Cobalt-Deficient in Sheep by Injection Vitamin B 12. *Nature,* **170**: 792-793.

74 — Mc Gowan, J. P. & W. G. Smith — 1922 — "Pining, Vinquish or Daising in Sheep. *Scot. J. Agric.,* **5**: 274-286.

75 — Mc Naught, K. J. — 1937 — Cobalt content of limonites used in treatment of bush sickness. *N. Z. J. Sci. Technol.,* 18: 655-661.

76 — Mc Naught, K. J. — 1938 — Cobalt content of Both Pastures. *N. Z. J. Agric.,* **57**: 209-210.

77 — Mc Naught, K. J. — 1938 — The Cobalt content of North Island Pastures. *N. Z. J. Sci. Technol., 20-A*: 14-30.

78 — Mc Naught, K. J. — 1948 — Cobalt, Copper and Iron in the Liver in Relation to Cobalt Deficiency Ailment. *N. Z. J. Sci. Technol., 30-A*: 26-43.

79 — Melrose, G. B. — 1938 — Top-dressing with Cobalt. Arohena Experiment. *N. Z. J. Agric.,* **57**: 211-212.

80 — Mitchell, R. L., R. O. Scott & A. B. Stewart — 1941 — Cobalt Manuring and Pining in Stock. *Nature,* **148**: 725-726.

81 — Moore, H. O. — 1938 — Studies on Coast Disease of Sheep in South Australia. *Commonwealth Austral. Counc. Sci. Ind. Res., Bull.* N.º 113, pp. 86-91.

82 — Neal, W. M. & C. F. Ahmann — 1937 — Cobalt as a Essential Element in Animal Nutrition. *Science,* **86**: 225-226.

83 — Neal, W. M. & C. F. Ahmann — 1937 — The Essentiality of Cobalt in Bovine Nutrition. *J. Dairy Sci.,* **20**: 741-753.

84 — Neal, W. M. & R. B. Becker — 1933 — The Hemoglobin Content of the Blood of Healthy and Anemic "Salt Sick" Cattle. *J. Agric. Res.,* **46**: 557-563.

85 — Neal, W. M. & R. B. Becker — 1933 — The composition of feed-stuffs in relation to nutritional anemia in cattle. *J. Agric. Res.,* **47**: 249-255.

86 — Neal, W. M., R. B. Becker & A. L. Shealy — 1931 — A Natural Copper Deficiency in Cattle Rations. *Science,* **74**: 418-419.

87 — Orten, J. M., F. A. Underhill, E. R. Mugrage & R. C. Lewis — 1932 — Production of Experimental Polycythemia with Cobalt. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **29**: 174-176.

88 — Patterson, J. B. E. — 1937 — Cobalt, and Sheep Diseases. *Nature,* **140**: 363.

89 — Patterson, J. B. E. — 1938 — Some Observations on a Disease of Sheep on Dartmoor. *Empire J. Exp. Agric.,* **7**: 262-267.

90 — Patterson, J. B. E. — 1946 — Cobalt as a Preventative of "Pining" in Cornwall and Devon. *Nature,* **157**: 555.

91 — Rickes, E. L., N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood & K. Folkers — 1948 — Cristaline Vitamin B 12. *Science,* **107**: 396.

92 — Rigg, T. & H. O. Askew — 1934 — Soil and Mineral Supplements in the Treatment of Bush-Sickness. *Empire J. Exp. Agric.*, **2**: 1-8.

93 — Rigg, T. & H. O. Askew — 1936 — Further Investigations on Bush-Sickness at Glenhope, Nelson, New Zealand. *Empire J. Exp. Agric.*, **4**: 1-5.

94 — Russell, F. C. — 1944 — Mineral in Pasture Deficiencies and Excesses in Relation to Animal Health. Imperial Bureau of Animal Nutrition, Technical Communication N.º 15, Rowett Inst., Bucksburn, Aberdeen, Scotland.

95 — Rusoff, L. L., L. H. Rogers & L. W. Gaddum — 1937 — Quantitative determination of copper and estimation of other trace elements by spectrographic methods in wire grasses from "Salt Sick" and Healthy areas. *J. Agric. Res.*, **55**: 731-738.

96 — Shorb, M. S. — 1948 — Activity of Vitamin B 12 for the Growth of Lactobacillus lactis. *Science*, **107**: 397-398.

97 — Smith, E. L. — 1948 — Presence of Cobalt in the Anti-Perniciosa Anaemia Factor. *Nature*, **162**: 144-145.

98 — Smith, S. E., B. A. Koch & K. L. Turk — 1951 — The Response of Cobalt-Deficient Lambs to Liver Extract and Vitamin B 12. *J. Nutrition*, **44**: 455-464.

99 — Stanton, D. J. & E. B. Kidson — 1939 — Cobalt Status in Soils and Pastures in the Sherry and Wangapeka Districts, Nelson. *N. Z. J. Sci. Technol., 21-B:* 65-76.

100 — Stewart, J. — 1946 — Cobalt and Pining. *Scot. J. Agric.*, **26**: 6-18.

101 — Stewart, W. L. & A. P. Ponsford — 1936 — Border Pining in Sheep. II. *J. Comp. Pathol. Therap.*, **49**: 49-62.

102 — Stewart, J., R. L. Mitchell & A. B. Stewart — 1941 — Pining in Sheep: Its Control by Administration of Cobalt and by Use of Cobalt-rich Fertilizers. *Empire J. Exp. Agric.*, **9**: 145-152.

103 — Stewart, J., R. L. Mitchell & A. B. Stewart — 1942 — Pining in Sheep: II. Confirmatory Experiments on its Control by Cobalt-rich Fertilizers. *Empire J. Exp. Agric.*, **10**: 57-60.

104 — Stewart, W. L. & S. E. Piercy — 1935 — Border Pining in Sheep. I. *J. Comp. Pathol. Therap.*, **48**: 157-191.

105 — Sylvester, N. D. & L. H. Lampitt — 1935 — The Determination of Copper in Foods with Special Reference to Milk. *Analyst*, **60**: 376-382.

106 — Taylor, C. R. — 1938 — Top-dressing with Cobalt. Experiments in Bush-Sick Country. *N. Z. J. Agric.*, **57**: 206-208.

107 — Thomas, R. G. — 1938 — Studies on Coast Disease of Sheep in South Australia. *Commonwealth Austral. Counc. Sci. Ind. Res., Bull.* N.º 113, pp. 28-39.

108 — Underwood, E. J. — 1934 — Enzootic Marasmus — Iron Content of Liver, Kidney and Spleen. *Austral. Vet. J.* **10**: 87-92.

109 — Underwood, E. J. — 1937 — Cobalt — an essential element in animal nutrition — Australian Investigations. *Science*, **85**: 604-605.

110 — Underwood, E. J. & A. B. Beck — 1941 — Enzootic Marasmus: The relation of copper to incidence and treatment. *Austral. Vet. J.*, 17: 155-165.

111 — Underwood, E. J. & J. F. Filmer — 1935 — Enzootic Marasmus. The Determination of the Biologically Potent Element (Cobalt) in Limonite. *Austral. Vet. J.*, 11: 84-92.

112 — Underwood, E. J. & R. J. Harvey — 1938 — Enzootic Marasmus: The Cobalt Content of Soils, Pastures and Animals Organs. *Austral. Vet. J.*, 14: 183-189.

113 — Vaz, Z. — 1930 — Verificação e tratamento das principais helminthoses de animais domesticos. *Rev. Ind. Anim.*, N.º 7: 743-751.

114 — Waltner, K. & K. Waltner — 1929 — Kobalt und Blut. *Klin. Wschr.*, 8: 313.

Fig. 1 — Mapa do Estado de S. Paulo, apresentando as regiões atingidas pela carência de cobalto em bovinos.

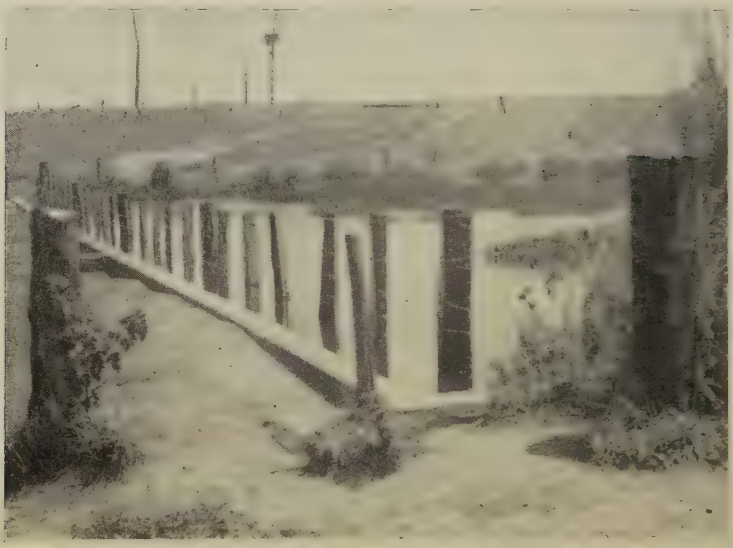


Fig. 2 — Açude, em uma fazenda de engorda de bovinos, construido para evitar a ingestão involuntaria de areia, tida como "causa" da "peste de secar". (Original)

Fig. 3 — Bebedouro construido de alvenaria e servido por agua de poço com o objetivo de "evitar" a "peste de secar". (Original)

Fig. 4 — Bovino adulto, da raça zebu, de uma fazenda da Sorocabana, com alta carência de cobalto. A análise do fígado deste animal apresentou o teôr de cobalto igual a 0,038 p.p.m.M.S. (Original)

Fig. 5 — Lote de bovinos, mestiços zebu, em uma fazenda da zona da Sorocabana, com a "Peste de Seca". (Original)

Fig. 6 — Garrote de 14 meses de idade, de crescimento retardado, de area "doente", ao lado de um de 8 meses e de area normal. (Original.)

Fig. 7 — Jacarandá do Campo — Apezar da bôa vegetação do capim colonião, os bovinos com "peste de secar" procuram suprir-se de cobalto comendo cascas de arvores, ricas deste elemento.

(Original)

Fig. 8 — Jequitibá com a casca comida pelos bovinos com a "peste de secar", em uma fazenda da zona da Noroéste.

(Original)

Fig. 9 — Bovino adulto da raça zebu, de uma fazenda da Alta Noroéste, na fase inicial da "peste de secar". (Original)

Fig. 10 — O mesmo bovino da fig. 9 suplementado diariamente com 2 miligramos de cobalto misturados no sal comum. (Original)

Fig. 11 — Sal comum distendido em terreiro sendo pulverizado com uma solução de cobalto, a fim de se obter uma uniforme distribuição do elemento mineral. (Original)

Fig. 12 — Sal comum cobaltisado colocado em côchos nas invernadas, para suplementação dos bovinos. (Original)

AÇÃO ESTIMULANTE, DO *B. COAGULANS*, ADMINISTRADO POR VIA ORAL, NO CRESCIMENTO DE RATOS ALBINOS

POR

V. O. Guida e J. P. Forster

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 1 figura no texto

Numerosas investigações (9, 29, 35, 39, 42, 50) admitem a hipótese de que os antibióticos estimulam o crescimento de pintos e porcos, através de alterações da flóra intestinal.

Outros pesquisadores (25) demonstraram, entretanto, que aquele estímulo sòmente aparece quando se associa aos antibióticos, a metionina ou a vitamina B 12.

Em 1947, MAC GINNIS e STEVENS (34) empregaram fezes de galinhas como fonte de fatores de crescimento, cuja origem foi atribuida ao *B. subtilis* contido naquele material, por STEPHENSON e col. (45).

Em uma série de trabalhos de pesquisa, nós e outros autores mostramos que vários germes esporulados têm a propriedade de produzir enzimas (15, 37, 43, 46), vitaminas (2, 5, 12, 16, 17, 30, 31, 33, 38, 41, 47) e antibióticos (1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 23, 24, 26, 27, 28, 32, 36, 40, 44, 46, 48, 49).

Administrados por via oral, a pacientes portadores de enterocolites crônicas e agudas, verificamos que ao lado da melhora dos processos gastrointestinais (meteorismo, diarréia, vômitos, etc.) havia uma progressiva melhora do estado geral do paciente (aumento do apetite, do peso, etc.) (7, 18, 19, 20, 21).

Em trabalho anterior (22) mostramos tambem que determinadas bactérias esporuladas aeróbias, administradas por via oral a frangas de 33 dias de idade, durante um certo período, resultavam num aumento considerável no volume e peso dos ovos e numa maior postura.

Entre os vários microorganismos saprófitas estudados, selecionamos (17) o *B. coagulans* como um dos germes mais ativos na produção de antibióticos, enzimas e vitaminas. A dosagem microbiológica do têor da vitamina B 12, contida no corpo bacteriano desse microrganismo revelou a presença de 24 mcg daquela vitamina por grama de celulas sêcas e 350 mcg no filtrado de cultura.

Verificamos tambem que a amostra de *B. coagulans*, aqui estudada, produz enzimas que hidrolizam os glucídios e os protídeos, e

que o antibiótico que ele secreta atua sôbre numerosas bactérias patogênicas.

Procuramos no presente trabalho verificar si a administração do *B. coagulans*, por via oral, estimulava o crescimento de ratos albinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Ratos albinos da criação do Instituto Biológico, com um mês de idade, peso entre 35-40 grs. mantidos durante varios anos com a dieta *1*, resultando no desmame, a média de peso acima registrada.

Os animais foram separados em três grupos de 30 ratos; sendo cada um composto de 15 machos e 15 femeas.

O primeiro grupo continuava recebendo a dieta *1;* o segundo grupo recebia a dieta *2* (ração 1 suplementada diariamente com 1 ml, de uma emulsão de *B. coagulans*, contendo 1 milhão de esporos por ml); o terceiro grupo recebia a ração 3.

DIETA 1

Fubá	4.000 grs
Farinha de carne	500 grs
Farinha de osso	100 grs
Carbonato de calcio	50 grs
Sal	50 grs
Agua	5 litros

DIETA 2

Dieta *1*
Suplemento diario de *B. coagulans*

DIETA 3

Fubá	10 Kg
Farelinho de trigo	3 Kg
Caseina	600 g
Farinha de carne	1.400 g
Mistura salina (*)	400 g
Banha	140 g
Fermento de cerveja	100 g
Alfafa	600 g
Oleo de fígado	200 g

(*) Mistura salina:

Fluoreto de sódio	5 g
Citrato de ferro amoniacal	15 g
Carbonato de magnesio	30 g
Tintura de iodo 10%	3 ml
Cloreto de potassio	150 g
Carbonato de calcio	500 g
Sal grosso	1000 g
Farinha de carne (60%)	2000 g
Farinha de osso em pó	10000 g

Os ratos foram colocados em gaiolas individuais, pesados quinzenalmente e registradas as médias de peso; ao atingirem o terceiro mês de idade, e segundo de tratamento, procedemos o acasalamento dos animais de cada grupo.

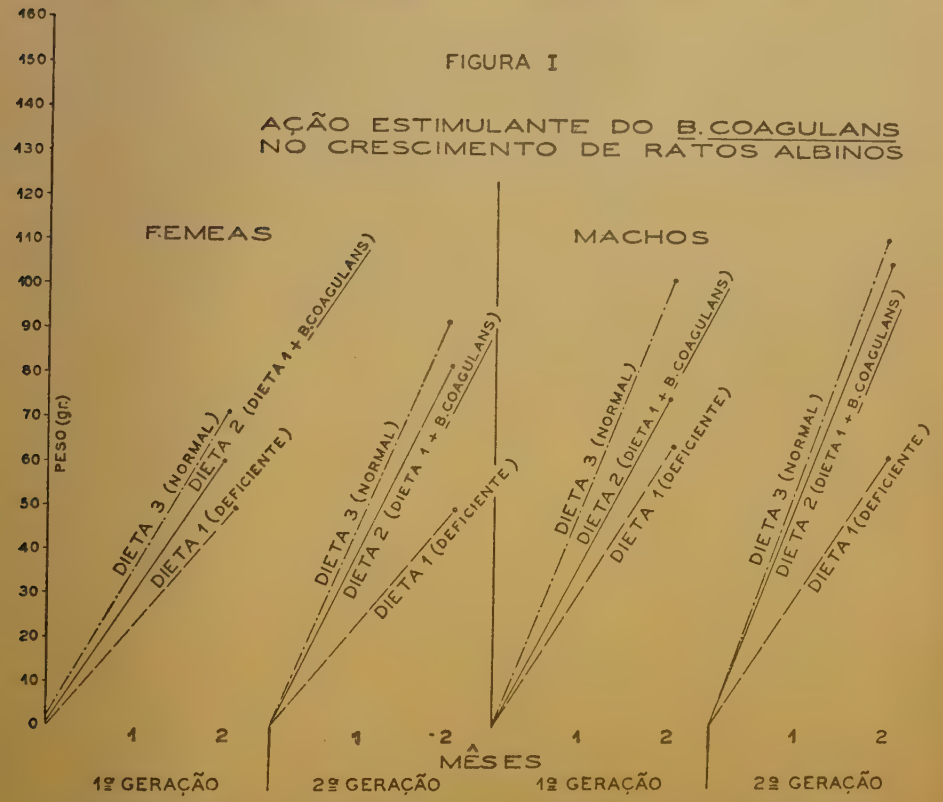
Após o nascimento, os novos ratos foram separados em 3 outros grupos de animais (15 femeas e 15 machos) que continuaram recebendo a alimentação idêntica aos da geração anterior; foram pesados quinzenalmente e registradas as médias de peso.

RESULTADOS

A Fig. 1 mostra que os ratos do grupo tratado com a dieta *1*, apresentam um crescimento deficiente; suplementando-se porém essa mesma ração com uma emulsão de *B. coagulans* (dieta *2*), verifica-

FIGURA I

AÇÃO ESTIMULANTE DO B. COAGULANS NO CRESCIMENTO DE RATOS ALBINOS



EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO B. COAGULANS, VIA ORAL, NO CRESCIMENTO DE RATOS ALBINOS

se que os ratos do grupo assim tratado mostram um crescimento mais acentuado do que o anterior. Comparando-se esses resultados com o do grupo tratado com a dieta *3*, mais completa que a dieta *1*, nota-se que os ratos que recebem as dietas *2* e *3* apresentam um desenvolvimento semelhante, não só entre os machos como tambem entre as fêmeas. Na segunda geração essa diferença se acentua ainda mais.

Estes resultados permitem demonstrar que o *B. coagulans*, através de seus enzimas, vitaminas e antibióticos, estimula o crescimento de ratos albinos tratados com uma ração deficiente; apresentam um desenvolvimento idêntico ao obtido com uma ração normal. Isto nos mostra que o *B. coagulans* não só é capaz de promover um melhor aproveitamento dos alimentos através dos antibióticos e enzimas que secreta, como tambem servir como fonte de vitaminas necessárias ao organismo.

Estes resultados demonstram a importância das bactérias esporuladas aeróbias como fonte de fatores de crescimento.

DISCUSSÃO

O *B. coagulans* estimula o crescimento de ratos albinos. Suplementando-se uma dieta deficiente em proteinas, com culturas do *B. coagulans*, o crescimento de ratos albinos insuficientemente desenvolvidos através de gerações sucessivas, se acentua na primeira geração, tornando-se consideravel na segunda geração. Esse efeito é devido à ação de antibióticos, enzimas e vitaminas que ele produz.

O crescimento é comparável ao obtido com grupos de ratos tratados com uma dieta mais rica; este resultado, provavelmente, é devido à associação do antibiótico, da vitamina B 12 e dos enzimas produzidos pelo *B. coagulans*, com ação digestiva sôbre os proteídios e glucídios.

Ratos tratados com uma dieta deficiente têm seu desenvolvimento retardado.

CONCLUSÕES

O *B. coagulans* estimula o crescimento de ratos tratados com dieta deficiente em proteinas.

Este resultado, provavelmente é devido à associação do antibiótico (coalina) e da vitamina B 12, produzidos pelo *B. coagulans;* além desses fatores estimulantes podemos ainda considerar as outras vitaminas que ele sintetiza, bem como os enzimas proteolíticos e sacarolíticos que aumentam a digestão e absorpção dos alimentos.

RESUMO

Na presente pesquisa, o autor demonstra que o *B. coagulans* estimula o crescimento de ratos albinos.

Os resultados obtidos demonstram que aquele microrganismo saprófita é capaz de estimular o crescimento de um grupo de ratos, alimentado com uma dieta deficiente. A curva de crescimento é idêntica a de um outro grupo de ratos corretamente alimentado.

STIMULANT ACTION OF *B. COAGULANS*, ADMINISTRATED BY ORAL WAY, IN THE GROWING OF ALBINO RATS

Abstract

It was demonstrated that the B. coagulans stimulates the growth of the albino rat.

The growing curve of a group of rats maintained under a deficient diet, to which a suspension of bacteria was administrated, was similar to the growth curve of a groupe maintained under normal diet.

The growth rate of those two groups was higher than that of the group maintained or a deficient diet.

The B. coagulans produces antibiotics, enzymes and vitamins. The vitamin B 12 is found in the bacterian body in high content.

BIBLIOGRAFIA

1) Ainsworth, G. C., Brown, A. M. & Brownledd, G. — 1947 — Aerosporin an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus greer*. *Nature*, **160**: 263.

2) Almquist, H. J., Pentler, C. F. & Mecchi, E. — 1938 — Synthesis of the anti-hemorragic vitamin by bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **38**: 336-338.

3) Barnes — Em 1949. Laterosporin A and Laterosporin B, antibiotics produced by *B. laterosporus*. *Brit. J. Exp. Path.*, **30**: 306.

4) Benedict, R. G. & Langlykke, A. F. — 1947 — Antibiotic activity of *B. polymyxa*. *J. Bact.*, **54**: 24.

5) Burkholder, P. R. & Mc Veight, I. — 1942 — Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **28**: 285-289.

6) Calow, R. K. & Hart, P. D. — 1946 — Antibiotic material from *B. licheniformis*, active against species of mycobacteria. *Nature*, **157**: 334.

7) Carvalhio, G., Ribeiro, C. & Guida, V. O. — 1957 — Tratamento de infecções intestinais infantís, pelo *B. cereus*, administrado por via oral. *Rev. de Pediatria Prática*. **28**: (5) 1-10.

8) Dubos, J. R. — 1939 — Studies on a bacterial agents extracted from soil Bacillus. I. Preparation of the agents. Its activity "in vitro". *J. Exp. Med.*, **70**: 1.

9) Elam, J. F., Gee, L. L. & Couch, J. R. — 1951 — Effect of feeding penicillin on the life cycle of the chick. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**: 393.

10) Foster, J. W. & Woodruff, H. B. — 1946 — Bacillin: a new antibiotic substance from soil isolated of *B. subtilis*. *J. Bact.*, **51**: 363.

11) Goodlow, R. J., Johnson, C. W. & Shaffer, M. V. — 1947 — The antagonistic effect of *B. cereus*. *J. Bact.*, **54**: 268.

12) Guha, B. C. — 1932 — The synthesis of vitamin B 1 and Bios, by *Bacillus vulgatus*. *Ind. J. Med. Research*, **19**: 977-983.

13) Guida, V. O. — 1955 — Estudos sôbre o antagonismo entre varios microrganismos. *O Hosp.*, 48 (1): 77-99.

14) Guida, V. O. — 1955 — Estudos sôbre a concorrência vital entre microrganismos.

I. Efeito antagonista do *B. coagulans*. *O Hosp.*, 48 (6): 747.
II. Efeito antagonista do *B. subtilis*. *R. Bras. Gaastroent.*, **7**: (5-6), 271.
III. Efeito antagonista do *B. brevis*. (No prélo).
IV. Efeito antagonista do *B. polymyxa*. *R. Brasil. Gastroent.*, **7** (5-6) 281.

15) Guida, V. O. — 1956 — Enzimas bacterianos, altamente ativos obtidos de culturas arejadas. (Não publicado).

16) Guida, V. O., Faria, A. L. & Forster, J. P. — 1956 — Microrganismos como fonte de vitaminas. *VIII Reun. An. da S. B. Prog. Ciencia.* Ouro Preto.

17) Guida, V. O. & Corrêa, R. — 1957 — Dosagem do teor de vitamina B 12 contida no corpo bacteriano e nos filtrados de cultura de bactérias esporuladas aeróbias. *An. Farm. Quim.* 8 (7-8): 6-12.

18) Guida, V. O. & Guida, H. A. — 1955 — Sôbre o emprego de bactérias esporuladas aeróbias, por via oral, no tratamento de enterocolites agudas e crônicas. *Geyer Notas*, **3** (9): 20-24.

19) Guida, V. O. & Guida, H. A. — 1954 — Atividade do *B. cereus* e *B. polymyxa*, administrados por via oral, no tratamento de enterocolopatias. *O Hosp.*, **46**: 159-173.

20) Guida, V. O., Guida, H. A. & Pasquali, O. — 1955 — Tratamento de enterocolites crônicas pelo *B. polymyxa* administrado por via oral. *An. Congr. Gastrent.*, Porto Alegre.

21) Guida, V. O. & Guida, H. A. — 1956 — Sôbre o emprego de bactérias esporuladas aeróbias, por via oral, no tratamento de enterocolites agudas e crônicas (*B. subtilis*, *B. laterosporus* e *B. licheniformis*). *Geyer Notas*, **11**: 1.

22) Guida, V. O. — 1957 — Bacilos esporulados aeróbios na alimentação de frangas. Efeito sôbre a postura e o peso dos ovos. *Arquivos do Inst. Biológico*. Vol., **24**: 227-231.

23) Hirschorn, H. N. Bucca, M. A. & Thayer, J. D. — 1948 — Subtenolin: an antibiotic from *B. subtilis*. Bacteriologic properties. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **67**: 429.

24) Jansen, E. F. & Hirschman, D. J. — 1944 — Subtilin — an antibacterial product of *Bacillus substilis;* culturing conditions an properties. *Arch. Biochem.* 4: 297.

25) Johansson, K. R. e col. — 1953 — Effects of dietary aureomycin upon the intestinal microflora and the intestinal synthesis of vitamin B 12 in the rat. *J. Nutr.*, 49: (1): 135-152.

26) Johnson, B. A., Anker, H. & Meleney, F. L. — 1945 — Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Sci.*, 102: 376.

27) Johnson, E. A. & Burodn K. L. — 1946 — Emycin: a new antibiotic active against pathogenic fungi an highter bacteria incluing bacilli of tuberculosis and diphteriae. *J. Bact.*, 51: 590.

28) Johnson, C. W., West, H. D., Jones, H. L. & Long, C. J. — 1949 — Biocerin an antibiotic produced by *B. cereus. J. Bact.*, 57: 63.

29) Kratzer, F. H., Grau, C. R., Starr, M. P. & Reynolds, D. M. — 1951 — Growth promoting activities of antibiotics and yeast cultures for chicks and turkey poultry. *Fed. Proc.*, 10: 386.

30) Landy, M., Sarkum, N. W. & Oswald, E. J. — 1943 — Bacterial synthesis of p-amino-benzoic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 52: 338-341.

31) Landy, M. & Dickens, D. M. — 1941 — Biotin synthesis by microorganisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46: 1086-1092.

32) Landy, M. Warren, G. H., Roseman, S. B. & Colio, L. G. — 1948 — Bacillomycin: an antibiotic from *B. subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 67: 539.

33) Mc Elroy, L. W. & Gross, H. — 1940 — A quantitative study of vitamins in the rumen contents of sheep and cow fed vitaamins low diets. *J. Nutr.*, 20: 527-550.

34) Mac Ginnis, J. — 1947 — Citado por Trivelin, A. P. — 1951 — A terra na alimentação de pintos. *Ann Esc. Sup. Agric. L. Queiroz.* Piracicaba. Separata n.° 152.

35) March, B. & Biely, J. — 1952 — The effect of feeding aureomycin on the bacterial content of chick feces. *Poultry Sci.*, 31: 177.

36) Newton, G. G. F. — 1949 — Antibiotics from a strain of *B. subtilis*: bacilipin A and B and bacilysin. *Brit. J. Exp. Path.*, 30: 306.

37) Ramon, G. Richou, R. & Ramon, P. — 1944-1945 — De l'antagonisme microbien en général et en particulier des propriétés antagonistes des filtrats de culture du *B. subtilis*, à l'égard de certain bactéries et des toxines microbiennes. *Rev. Immun.*, 9 (5-6): 11-217.

38) Roders, N. E. — 1942 — The synthesis of riboflavin by microorganisms. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin.

39) Romoser, G. L., Shorb, M. S., Combs, G. F. & Pelczar Jr., M. J. — 1952 — Effect of antibiotics and diet composition on cecal bacteria and growth of chicks. *Antibiotic Chemother.*, 2: 42.

40) Saint Rat, L. & Olivier, H. R. — 1946 — Extraction and purification of endosubtilysine. *C. R. Acad. Sc.*, 222: 296.

41) Scheunert, A. & Schieblich, M. — 1923 — Biochem. Zeit. 139, 57. Citado por Bulkholder e Mac Veight. — 1942 *Proc. N. As. Botany*, 28: 285.

42) Sieburth, J. M., Mac Ginnis, J. & Skinner, C. E. — 1952 — The effect of terramycin on the antagonism of certain bacteria against species of proteus. *J. Bact.*, 64: 163.

43) Smith, N. — 1946 — Aerobic mesophilic spore forming bacteria. *Misc. Publ.* 559, U. S. Dep. Agric.

44) Stansly, P. G., Shepherd, R. G. & White, H. J. — 1947 — Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 8: 43.

45) Stephenson, E. L., Mac Ginnis, J., Grahan, W. D.& Carver, J. S. — 1948 — Effect of soil on chick growth. *Poultry Sci.*, 27: 827-828.

46) Tilden, B. E., Hudson, C. S. — 1942 — Preparation and properties of the amylases produced by *Bacillus mascerans* and *Bacillus polymyxa*. *J. Bact.*, 43: 527-544.

47) Tittsler, R. P. & Wihttier, E. O. — Synthesis of riboflavin by bacteria and its role in symbiosis. *J. Bact.*, 42: 151.

48) Vallee, M. — 1945 — Etude du pouvoir bacteriolytique de *B. subtilis*. *C. R. S. Biol.*, 139: 148.

49) Walton, R. B. & Woodruff, H. B. — 1949 — A cristaline antifungal agent mycosubtilin, isolated from subtilin broth. *J. Clin. Invest.*, 28: 924.

50) Williams, W. L., Taylor, R. R., Stokstad, L. R. & Sukes, T. H. — 1951 — Mechanism of the growth-promoting effect of aureomycin in chicks. *Fed. Proc.*, 10: 270.

Vol. 24 — Artigo 17 Novembro de 1957

SÔBRE A INFLUÊNCIA DE BACTÉRIAS ESPORULADAS AERÓBIAS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGAS

EFEITO SÔBRE A POSTURA E O PÊSO DOS OVOS

POR

V. O. Guida

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 2 tabelas no texto

Numerosos pesquisadores (8-24-30-34-37-45) admitem a hipótese de que os antibióticos estimulam o crescimento de pintos e porcos, através de alterações da microflóra intestinal (destruição de bactérias espoliadoras de factores de crescimento).

JOHANSSON & PETERSON (5) demonstraram, entretanto, que a aureomicina, administrada a ratos albinos, por via oral, apesar de provocar modificações na flóra intestinal, não estimula o crescimento dos animais, alimentados com uma ração normal. Verificaram, tambem, que a aureomicina sòmente estimula o crescimento de ratos albinos quando mantidos em uma ração purificada, suplementada de vitamina B 12 ou metionina.

Em 1947, MAC GINNIS (7) e STEVENS empregaram fezes de galinhas como fonte de fatores de crescimento, cuja origem atribuiram a microrganismos contidos no escremento. Em 1948, STEPHENSON (11) e col. mostraram que o *B. subtilis*, encontrado comumente nas fezes de galinhas, continha vários fatores de crescimento.

Em uma série de trabalhos sôbre varios germes esporulados aeróbios, realizados por nós e por outros pesquisadores, foi demonstrado que esses microorganismos produzem antibióticos, enzimas e vitaminas. Ratos em carência experimental (2) de vitamina B 1, tratados preventivamente com germes esporulados aeróbios, por via oral, não apresentaram polineurite. Dosagens microbiológicas (2) de filtrados de cultura dos germes esporulados aeróbios, mostraram que esses microrganismos sintetizam acido nicotínico em quantidade muito superior a *E. coli*. GUIDA e CORRÊA (3) verificaram que o teôr da vitamina B 12, existente no corpo bacteriano dos germes esporulados aeróbios, era de cêrca de 34 cmg por gr de bactérias sêcas do *B. brevis* e 28 mcg do *B. coagulans;* o filtrado de cultura dêste germe continha 350 mmcg por ml.

Numerosas observações mostram que os germes esporulados aeróbios atuam não só sôbre a flóra anormal intestinal, através dos antibióticos que produzem, como tambem são capazes de influir favo-

ravelmente no estado geral do organismo, por intermedio de enzimas e vitaminas que elaboram.

No presente trabalho procuramos verificar si a administração de germes esporulados aeróbios, por via oral, á franguinhas de 33 dias de idade, poderia influir favoravelmente no estado geral desses animais, de modo a permitir, posteriormente, aumento do peso dos ovos e melhor postura.

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos no trabalho franguinhos de 33 dias de idade, da raça New Hamsphire; foram separados em cinco grupos, cada um com dez femeas e dois machos, todos recebendo a mesma ração. Quatro grupos eram suplementados, respectivamente, com uma emulsão do *B. subtilis*, do *B. polymyxa*, do *B. brevis* e do *B. cereus*, contendo 1 milhão de esporos por ml. Os animais receberam a dose de 1 ml diariamente, até o início da postura, ou seja, durante mais ou menos três meses e meio. O número e o pêso dos ovos foram anotados diariamente, durante um período de sete meses.

Os animais foram alimentados com uma ração comercial, fornecida ao Instituto Biológico, que consistia em:

Farelo grosso de trigo	60 kg
Farelinho fino de trigo	60 kg
Refinasil	50 kg
Fubá	60 kg
Farinha de carne 60%	45 kg
Farinha de ostras, fina	8 kg
Sal, bem peneirado	2,500 g

Verduras.

De 1 a 2 meses, 80% mistura e 20% quirera
De 2 a 3 meses, 60% mistura e 40% quirera
De 3 meses em diante milho.

RESULTADOS

TABELA I

Influência no pêso dos ovos

Microrganismo administrado	Número de aves tratadas	Média global do pêso dos ovos (Período de 7 meses)
B. subtilis	10	53,78 g
B. polymyxa	10	52,21 g
B. brevis	10	54,65 g
B. cereus	10	51,07 g
Testemunhas não tratadas	10	46,87 g

Ao nivel de probabilidade, 0,05, não há diferenças significativas entre os tratamentos com o *B. subtilis* e o *B. brevis*, e o *B. polymyxa* e o *B. cereus*, mas há diferença significativa entre esses dois grupos, não só entre si, como tambem em relação ao grupo testemunha.

TABELA II

Influência na postura

Microrganismo usado	Número de aves tratadas	Média mensal de ovos em 7 meses de postura
B. subtilis	10	21
B. polymyxa	10	15
B. brevis	10	15,6
B. cereus	10	15
Testemunhas não tratadas	10	14

Os resultados obtidos nas TABELAS I e II mostram que nas condições de experiência, usando-se uma ração comercial, as diferenças obtidas entre os grupos tratados e o testemunha demonstram que os germes esporulados exercem uma influência benéfica no estado geral dos animais, permitindo uma maior postura e ovos de maior pêso.

Pudemos verificar no decorrer das experiências que, após o segundo mês de postura, os ovos das aves tratadas atingiam o pêso de 55 g, enquanto que no grupo testemunho esse resultado só foi obtido no sétimo mês.

O aumento da postura e do pêso dos ovos deve prender-se à maturidade sexual dos animais e ao fator alimentar; a administração dos germes esporulados deverá produzir no organismo uma ativação do metabolismo através dos enzimas, vitaminas e antibióticos, que influiriam no desenvolvimento precoce do animal, permitindo aqueles resultados.

CONCLUSÃO

A administração de germes esporulados aeróbios, por via oral, diariamente a frangas de 1 mês de idade, influi favoravelmente no aumento da postura e no pêso dos ovos.

RESUMO

Na presente pesquisa, o autor demonstra que quando se administram bactérias esporuladas aeróbias (*B. subtilis, B. polymyxa, B. brevis* e *B. cereus*) como suplemento de uma ração, á frangas de 33 dias, até à época da postura, não só ha um aumento de pêso dos ovos como tambem da postura.

Esse estímulo é, de acôrdo com pesquisas de outros autores, provocado pelos antibióticos, enzimas e vitaminas que os germes esporulados produzem.

SPORULATED AEROBIC BACTERIA AS A SUPPLEMENT FOR PULLET FEEDING

Study of the influence on the weight of eggs and on the laying capacity

A b s t r a c t

Suspension of sp. aer. bact. (B. s u b t i l i s, B. b r e v i s, B. c e r e u s and B. p o l y m y x a) were administrated to pullets as a supplement to their diet. This treatment started when they were 33 days old and lasted till they started laying.

A statistically significant increase of the weight and number of eggs layed by the treated group was observed.

The increase was specially significant for the weight and laying capacity of the B. b r e v i s and B. s u b t i l i s treated group respectivelly.

BIBLIOGRAFIA

1) Dubos, R. J. — 1939 — Studies on a bacterial agents extracted from soil Bacillus. I. Preparation of the agents. Its activity "in vitro". *J. Exp. Med.*, **70**: 1.

2) Guida, V. O., Faria, A. L. & Forster, J. P. — 1956 — Microrganismos como fonte de vitaminas. *VIII Reun. An. da S. B. Prog. Ciencia.* Ouro Preto.

3) Guida, V. O. & Corrêa, R. — 1957 — Dosagem do teor de vitamina B 12 contida no corpo bacteriano e nos filtrados de cultura de bactérias esporuladas aeróbias. *An. de Farmacia e Quimica.* 8 (7-8): 6-12.

4) Guida, V. O. e Forster, J. P. — 1957 — Ação estimulante do *B. coagulans*, no crescimento de ratos albinos. *Arq. Inst. Biol., Vol.* 24: 229-236.

5) Johansson, K. R. e col. — 1953 — Effects of dietary aureomycin upon the intestinal microflora and the intestinal synthesis of vitamin B 12 in the rat. *J. Nutr.* 49: (1): 135-152.

6) Kratzer, F. H., Grau, C. R., Starr, M. P. & Reynolds, D. M. — 1951 — Growth promoting activities of antibiotics and yeast cultures for chicks and turkey poultry. *Fed. Proc.*, **10**: 386.

7) Mac Ginnis, J. — 1947 — Citado por Trivelin, A. P. — 1951 — A terra na alimentação de pintos. *Ann. Esc. Sup. Agric. L. Queiroz.* Piracicaba. Separata n.º 152.

8) March, B. & Biely, J. — 1952 — The effect of feeding aureomycin on the bacterial content of chick feces. *Poultry Sci.*, **31**: 177.

9) Romoser, G. L., Shorb, M. S., Combs, G. F. & Pelczar, Jr., M. J. — 1952 — Effect of antibiotics and diet composition on cecal bacteria and growth of chicks. *Antibiotic Chemother.*, **2**: 42.

10) Sieburth, J. M., Mac Ginnis, J. & Skinner, C. E. — 1952 — The effect of terramycin on the antagonism of certain bacteria against species of proteus. *J. Bact.*, **64**: 163.

11) Stephenson, E. L., Mac Ginnis, J., Grahan, W. D. & Carver, J. S. — 1948 — Effect of soil on chick growth. *Poultry Sci.*, 27: 827-828.

12) Williams, W. L., Taylor, R. R., Stokstad, L. R. & Sukes, T. H. — 1951 — Mechanism of the growth-promoting effect of aureomycin in chicks. *Fed. Proc.*, **10**: 270.

Vol. 24 — Artigo 18 Novembro de 1957

UMA NOVA ESPÉCIE DE *"DIORYMERELLUS"* (COL. *CURCULIONIDAE BARININAE*) PREJUDICIAL ÁS ORQUIDEAS

POR

José Pinto da Fonseca

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto

O genero *Diorymerellus* inclui certas espécies neotrópicas de *Curculionidae Barininae*, algumas das quais conhecidas como pragas de orquidaceas.

Até 1942, conheciam-se doze espécies: uma do México, cinco da América Central, quatro das Antilhas e duas do Brasil.

No presente trabalho, demos a descrição de mais uma espécie, do Brasil, encontrada sôbre flores de orquidea, notadamente em espécies dos generos *Cattleya* e *Laelia*.

O inseto põe os ovos no ovário e na estapa, partes estas de que as larvas se alimentam, danificando, por completo, as flôres.

Diorymerellus vigintiestriatus n. sp.

Fêmea: Corpo oblongo, ligeiramente convexo, preto, luzidio, pontuado. Cabeça fina e dispersamente pontuada, abaulada nas regiões verticais e ocipital; fronte leve e transversalmente depressa junto à base superior, entre os olhos. Rostro ligeiramente mais longo do que o pronoto, levemente espesso na região anterior; de perfil, em curva perfeita; visto pela parte superior, mostra-se de uma só largura, com as linhas de contôrno laterais paralelas; região basal dorsal fina e dispersamente pontuada; área dorsal, nas regiões mediana e anterior, fina e irregularmente rugosa-estriada; região inferior lateralmente plana; tegula elevada, saliente; sulco antenal medindo, mais ou menos, um terço do comprimento do rostro, levemente dilatado na extremidade apical. Antenas castanho-escuras, quasi pretas; quando o escapo acha-se encachado no sulco antenal a antena ultrapassa a margem anterior da inserção do primeiro par de pernas; massa ovalada, mais escura do que as partes restantes das antenas, provida de densa pilosidade serícea, levemente fulvescente. Olhos pretos, luzidios, oblongos.

Pronoto preto, luzidio; visto pela região dorsal, mais ou menos triangular, ligeiramente entumescido, mais largo do que longo, apresentando maior espessura na região basal, elevando-se, progressivamente, para a região anterior; regiões laterais e anterior, quasi direitas; região posterior direita nos lados, bissinuada no centro, na altura do escutelo; angulos laterais posteriores perfeitamente arredondados. De perfil, a linha superior de contôrno mostra-se quasi reta; margens lateral e inferior da área epimeral, direitas; toda a superfície do pronoto se apresenta pontuada, sendo que na superfície superior a pontuação é fina e dispersa, tornando-se, porém, progressivamente mais serrada

para os lados do pronoto, mais fina e mais serrada nas regiões esternal e episternal; esterno liso, luzidio, concavo, alargando-se para a extremidade anterior, tomando forma oval. Toda a superfície do pronoto se apresenta glabra e luzidia, exceto, porém, junto à margem inferior epimeral, que se acha provida de poucos pêlos seríceos, fulvescentes e recumbentes; área posterior do epímero, depressa, grossamente pontuada, com a margem posterior mais ou menos direita.

Élitros mais largos do que o pronoto. Visto pela região dorsal, trazem as linhas laterais de contôrno direitas, tornando-se estas, porém, progressivas e levemente aproximadas em direção à região posterior, onde terminam em arco perfeito, com leve reentrância junto à sutura dos élitros. De perfil, da base à extremidade apical, a linha de contôrno superior se apresenta levemente convexa; cantos externos dos élitros, salientes, elípticos e lisos; margem anterior ligeiramente arqueada, inteira; cantos internos arredondados, bem afastados do escutelo; margens externas em linha obliqua, direitas junto ao mesopímero, tornando-se, em seguida, bissinuadas para a parte posterior, onde terminam em

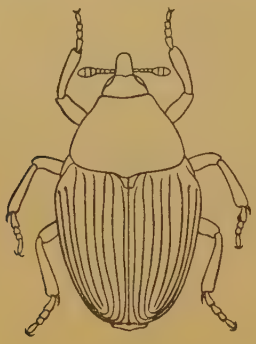


Fig. 1

Fig. 2

Diorymerellus vigintiestriatus n. sp. Fig. 1, visto de cima; Fig. 2, idem, de lado.

canto arredondado. Cada élitro acha-se provido de dez estrias ou sulcos longitudinais. A primeira estria, a contar da margem externa, é bem estreita, tem início quasi junto à margem anterior dos élitros, e prolongando-se até à altura do terceiro tergite abdominal. Dêste tergite, para a extremidade apical, as estrias primeira e segunda, se fundem; terceira e quarta estrias, iniciando-se distante da margem dos élitros, sôbre a parte posterior dos cantos externos elitrais; a terceira estria se apresenta mais curta do que a quarta estria; ambas estas estrias têm início junto à margem externa dos élitros e se apresentam idênticas em largura; as estrias terceira, quarta, sexta e sétima, tornam-se interrompidas na região posterior dos élitros. Ao longo das estrias nota-se pontuação bem pronunciada e espaçada; inter-espaços lisos, luzidios, providos de pontuação extremamente fina e dispersa; os inter-espaços segundo, nono e décimo, são mais largos do que os demais; os inter-espaços terceiro, quarto e quinto, fundem-se junto aos cantos externos dos élitros, formando, para a região anterior, um inter-espaço alargado; os inter-espaços terceiro, quarto e nono fun-

dem-se na região posterior, bem assim os inter-espaços sexto, sétimo e oitavo; declividade elitral levemente pronunciada; extremidade apical arredondada.

Escutelo quadrangular, liso, luzidio, ligeiramente concavo em sentido longitudinal; margens laterais e posterior, direitas; margem anterior levemente convexa.

Mesosterno e metasterno providos de pontuação grossa e esparsa, trazendo, cada ponto, um minúsculo pêlo seríceo, fulvescente e recumbente; margem lateral do mesoterno provida de uma carreira muito regular de pontos grossos.

Metasterno apresentando, nas margens superior e inferior, uma carreira longitudinal de pontos; margens anterior e superior mostrando númerosos pontos, os quais, na margem anterior em maior número, mais acumulados e mais finos.

Abdomen provido de pontuação fina e dispersa, mais cerrada sôbre a seção posterior do quinto esternite, bem como nas margens laterais e posterior dos esternites terceiro e quarto.

Pigídio arredondado, fino e densamente pontuado.

Pernas com as coxas globulares, trazendo pilosidade grossa e escassa; fêmures densamente pontuados nos lados externo e interno; região apical interna provida de rugosidade muito fina; todas as pontuações sôbre os fêmures trazem um pêlo fino, seríceo, fulvescente e recumbente.

Tíbias longitudinalmente estriadas e providas de pontuação fina e pouco cerrada; face inferior trazendo, longitudinalmente, um sulco estreito; toda a superfície das tíbias acha-se revestida de pêlos curtos e procumbentes, pêlos êsses que, na região epical das tíbias, formam pequeno tufo; extremidade apical provida de um espinho curvo e ponteagudo; tarsos com unha bifidas e fracas.

Comprimento, da curvatura do rostro à extremidade apical do abdomen, 7.00 mm; largura, entre os cantos umerais, 4.00 mm.

O macho difere da fêmea por se apresentar de menor tamanho.

A presente espécie distingue-se de suas congêneres, principalmente, por trazer déz estrias em cada élitro.

Cotipos: 1 macho e 12 fêmeas, incorporados às coleções do Instituto Biológico, São Paulo, sob o número 4128.

Habitat: Araraquara, Estado de São Paulo, 12 exemplares coletados sôbre orquidea, pelo Sr. Delfim Carlos Alves, e um espécimen coletado em São Paulo (Capital), pelo Sr. Jacintho Guerin.

THE NEW SPECIE OF *"DIORYMERELLUS"* (COL. *CURCULIONIDAE BARININAE)*, SERIOUS PEST OF ORCHIDS

Abstract

A new species of the genus Diorymerellus Champion, from Brazil, is described in this paper.

This insect has been found to be a serious pest of cultivated orchids. The types are in the collection of the Instituto Biológico, S. Paulo, Brasil.

BIBLIOGRAFIA

BLACKWELDER, R. E. — 1947 — Check, list of the Coleopterous Insects of Mexico, Central América, The West Indies, and South America, *United States National Museum, Bulletin 155*, Part. 5, p. 904.

CHAPION, F. Z. S. — 1908 — Biologia Central-Americana, Insecta, Coleoptera *(Curculionidae; Curculioniae)* Vol. 4, pt. 5 p. 253.

CHEVROLAT, L. A. A. — 1880 — Diagnose de *Curculionide* du genere *Centrinus* de la Guadeloupe. *Le Naturaliste*, Vol. 2, p. 307.

HUSTACHE, A. — 1932 — *Curculionides* de la Guadeloupe. *Faune Colonial Française*, Vol. 5, p. 61.

MONTE, O. — 1942 — Duas novas espécies de *"Diorymerellus"* (Col. Curculionidae), prejudiciais às orquideas. *Arquivos do Instituto Biológico*, Vol. 13, pp. 87-90, 7 figs. 1 Est., São Paulo.

———o———

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A PEPTONA DE SOJA E A PEPTONA WITTE NA OBTENÇÃO DE TOXINAS ALTAMENTE TOXIGENAS DE *CL. TETANI*

VALOR ANTIGÊNICO DAS ANATOXINAS PREPARADAS COM AS TOXINAS OBTIDAS

POR

V. O. Guida e C. Troise

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Varios meios (1) de cultura têm sido empregados para a obtenção de toxina tetânica altamente tóxica. Na composição desses meios têm sido utilizados diversos tipos de peptona; LEGROUX & RAMON (4) incluiram no meio uma peptona preparada com estomago de porco, obtendo uma toxina tetânica, com títulos entre 50.000 e 70.000 DLM por ml. Posteriormente, em 1943, RAMON (7) emprega a papaina na digestão da carne e MULLER (5) a pepsina; no mesmo ano este ultimo autor (6) utiliza uma peptona de caseina digerida pela tripsina.

Na Seção de Bacteriologia do Instituto, empregamos para obtenção de toxina, anatoxina e sôro antitetânico, um meio descrito por BIER (3), substituindo-se a peptona de sangue pela peptona Witte e acrescentando-se 2% de sangue de carneiro desfibrinado. Os títulos dessa toxina variam entre 5.000 a 20.000 DLM por ml.

Como a peptona Witte, empregada no preparo do meio de cultura é de obtenção dificil e de alto preço, resolvemos experimentar uma peptona mais barata e que pudesse produzir uma toxina da mesma ou de maior potência.

A peptona de soja havia sido empregada (2) no preparo de meios de cultura e por isso nos decidimos empregá-la nesta experiência.

Solicitamos ao Dr. H. Jobim, Diretor científico do Laboratório Geyer, o preparo de uma peptona de soja e recebemos, por gentileza do mesmo, uma peptona de soja de digestão papaica.

MATERIAL E MÉTODOS

Os meios de cultura utilizados foram os seguintes:

a)	carne de coração	500 g
	agua da bica	1000 cm^3
	peptona de soja	10 g
	cloreto de sodio	5 g

b)	carne de coração	500 g
	agua da bica	1000 cm³
	peptona Witte	10 g
	cloreto de sodio	5 g
c)	carne de coração	500 g
	agua da bica	1000 cm³
	farinha de soja	1 g
	cloreto de sodio	5 g

Limpa-se o coração, passa-se na maquina, junta-se água à carne e deixa-se em maceração uma noite. No outro dia, aquece-se o material lentamente, agitando-se sempre, até à fervura, que é mantida durante 20 minutos. Filtra-se e adiciona-se ao filtrado, a peptona e o sal. Dissolve-se bem e acerta-se o pH a 7,2-7,3, acrescentando-se 200 g de figado de boi, em pedaços e autoclava-se a 120°C, 15 minutos. Reajusta-se o pH a 6,6 e filtra-se em papel xarope. Os pedaços de fígado são lavados em agua corrente e colocados no fundo do balão em que se distribuiu o filtrado. Esterilizar a 120°C, 20 minutos e finalmente cobrir com uma mistura prèviamente esterilizada, de partes iguais de vaselina sólida e vaselina líquida.

A semeadura foi feita com o meio a cerca de 50°C. Como semente foi usada uma cultura velha de mais de 6 meses de idade, de uma amostra de *Cl. tetani* bem toxígena. No momento da semeadura juntamos 2% de sangue de carneiro desfibrinado.

Foi utilizada uma amostra de *Clostridium tetani* — TS — oferecida pelo Dr. Ariosto Buller Souto, Diretor do Instituto Adolfo Lutz, de São Paulo. A amostra era conservada em meio de Condréa.

PARTE EXPERIMENTAL

Após semeadura do *Cl. tetani*, amostra TS, em balões contendo 300 ml, de cada meio, as culturas foram incubadas a 37°C, durante 11 dias. Nessa época, após filtração em Velas Chamberland Fl, a potencia das toxinas foi avaliada em cobaias que recebiam 1 ml, via subcutânea. A evolução dos sintomas em cobaias foi observada durante 4 dias. Os resultados estão expostos nos PROTOCOLOS I-V que correspondem à dosagem das varias partidas de toxina tetânica e na TABELA I, relativa à dosagem do valor antigênico das anatoxinas aqui estudadas.

PREPARO DA ANATOXINA

Uma vez obtidas as toxinas, elas foram transformadas em anatoxinas pela junção de 4% de formol e em seguida colocadas na estufa a 37°C durante 21 dias. Após esse período, procedemos à prova de inocuidade injetando 5 cm^3, via subcutânea, em cobaias de 350 grs. que eram observadas durante 15 dias. Realizada a prova de inocuidade, vacinamos lotes de 10 cobaias para cada anatoxina; decorridos 30 dias, as cobaias foram inoculadas com 10 DLM de uma toxina sêca TMI, preparada no laboratório em 1938, e conservada até o presente; concomitantemente foram injetadas 4 cobaias testemunhas que receberam 1 DLM.

PROTOCOLO I

Meio de cultura com farinha de soja 1°/₀₀

Cobaia	Peso	Toxina	1.° dia	2.°	3.°	4.°
1	310	1/5000	cc	+		
2	300	1/10000	cc	ccc	+	
3	300	1/25000	c	cc	ccc	+
4	300	1/50000	1c	c	ccc	+

Meio de cultura com peptona de soja 1%

1	300	1/5000	cc	+		
2	320	1/10000	cc	+		
3	300	1/25000	c	+		
4	310	1/50000	c	+		

Meio de cultura com peptona Witte 1%

1	330	1/5000	0	cc	cc	cc
2	340	1/10000	0	cc	cc	cc
3	330	1/25000	0	0	0	cc
4	310	1/50000	0	0	0	cc

0 = negativo
c = contração
cc = contração acentuada
ccc = contração forte
\+ = morte

PROTOCOLO II

Farinha de soja 1‰

Cobaia	Peso	Toxina	1.º dia	2.º	3.º	4.º
1	345	1/5000	cc	+		
2	320	1/10000	c	ccc	+	
3	355	1/25000	c	cc	cc	+
4	320	1/50000	1c	c	c	cc
5	345	1/75000	0	0	0	0
6	335	1/100000	0	0	0	0

Peptona de soja 1%

1	345	1/5000	ccc	+		
2	345	1/10000	cc	+		
3	335	1/25000	cc	cc	+	
4	335	1/50000	cc	cc	cc	+
5	350	1/75000	0	c	cc	cc
6	350	1/100000	0	c	cc	cc

Peptona Witte 1%

1	345	1/5000	0	0	0	0
2	320	1/10000	0	0	0	0
3	355	1/25000	0	0	0	0
4	320	1/50000	0	0	0	0
5	345	1/75000	0	0	0	0
6	335	1/100000	0	0	0	0

0 = negativo
c = contração
cc = contração acentuada
ccc = contração forte
\+ = morte

PROTOCOLO III

Farinha de soja 1%

Cobaia	Peso	Toxina	1.º dia	2.º	3.º	4.º
1	325	1/5000	0	cc	ccc	+
2	320	1/10000	0	c	cc	c
3	315	1/25000	0	0	1c	c
4	310	1/50000	0	0	0	0
5	315	1/75000	0	0	0	0
6	320	1/100000	0	0	0	0

Peptona de soja 1%

1	330	1/5000	c	+		
2	310	1/10000	c	qm	+	
3	315	1/25000	c	cc	+	
4	330	1/50000	c	cc	ccc	ccc
5	320	1/75000	1c	cc	ccc	ccc
6	315	1/100000	1c	c	cc	cc

Peptona Witte 1%

1	330	1/5000	c	+		
2	320	1/10000	c	qm	+	
3	330	1/25000	1c	cc	cc	+
4	310	1/50000	0	c	cc	ccc
5	315	1/75000	0	1c	c	cc
6	320	1/100000	0	0	1c	c

0 = negativo
1c = leve contração
c = contração
cc = contração acentuada
ccc = contração forte
qm = quasi morto
+ = morte

PROTOCOLO IV

Farinha de soja 1°/₀₀

Cobaia	Peso	Toxina	1.° dia	2.°	3.°	4.°
1	355	1/5000	ccc	+		
2	350	1/10000	cc	+		
3	345	1/25000	cc	+		
4	340	1/50000	c	+		
5	345	1/75000	cc	+		
6	340	1/100000	c	+		

Peptona de soja 1%

1	300	1/5000	ccc	+		
2	300	1/10000	cc	+		
3	315	1/25000	ccc	+		
4	300	1/50000	cc	+		
5	310	1/75000	cc	+		
6	300	1/100000	cc	+		

Peptona Witte 1%

1	305	1/5000	cc	+		
2	300	1/10000	cc	+		
3	310	1/25000	c	+		
4	320	1/50000	c	qm	+	
5	305	1/75000	c	cc	+	
6	300	1/100000	c	cc	+	

0 = negativo
c = contração
cc = contração acentuada
ccc = contração forte
qm = quasi morto
\+ = morte

PROTOCOLO V

Farinha de soja 1‰

Cobaia	Peso	Toxina	1.° dia	2.°	3.°	4.°
1	340	1/5000	cc	+		
2	315	1/10000	c	+		
3	300	1/25000	c	ccc	+	
4	320	1/50000	c	cc	+	
5	315	1/75000	1c	cc	cc	qm
6	330	1/100000	0	c	cc	qm
7	315	1/125000	0	c	cc	cc
8	345	1/150000	0	1c	c	c
9	300	1/175000	1c	c	c	c
10	325	1/200000	1c	c	c	c

Peptona de soja 1%

1	310	1/5000	ccc	+		
2	310	1/10000	ccc	+		
3	300	1/25000	cc	+		
4	320	1/50000	cc	+		
5	330	1/75000	c	qm	+	
6	315	1/100000	c	cc	+	
7	310	1/125000	c	cc	+	
8	320	1/150000	1c	cc	+	
9	330	1/175000	1c	c	+	
10	315	1/200000	1c	cc	+	

Peptona Witte 1%

1	350	1/5000	ccc	+		
2	310	1/10000	ccc	+		
3	300	1/25000	cc	+		
4	320	1/50000	c	+		
5	330	1/75000	c	ccc	ccc	
6	315	1/100000	1c	cc	cc	
7	355	1/125000	1c	cc	cc	
8	300	1/150000	1c	c	cc	
9	310	1/175000	c	cc	cc	
10	320	1/200000	0	0	cc	

0 = negativo
c = contração
cc = contração acentuada
ccc = contração forte
qm = quasi morto
\+ = morte

DOSAGEM DO VALOR ANTIGÊNICO ANATOXINAS TETANICAS PREPARADAS COM:

PEPTONA WITTE									PEPTONA DE SOJA									FARINHA DE SOJA								TESTEMUNHAS injetadas com 1 DLM TOXINA SECA em 1 cc salina via subcutânea				
VIDE PROTOCOLO V																													
VACINADAS COM 1 CC DE ANATOXINA TETANICA via subcutânea																													
Injetadas 1 mês após com 10 DLM toxina sêca em 1 cc salina via subcutânea																													
RESULTADOS																													
Cobaia n.º	DIAS								Cobaia n.º	DIAS								Cobaia n.º	DIAS							Cobaia n.º	DIAS			
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4
1	c	+							1	c	+							7-15	c	+							1	cc	+		
2	c	+							2	c	+																	2	c	+		
3	c	+							3	0	cc	+																3	0	cc	+	
4	c	+							4	0	0	c	cc	+														4	0	cc	+	
5	c	+							5	c	c	c	c	c	c	c	c															
6	0	cc	cc	+					6	c	c	c	c	c	c	c	c															
7	0	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	7-15	0	0	0	0	0	0	0	0														
8	0	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc																							
9-15	0	0	0	0	0	0	0	0																							

c = contração
cc = contração acentuada
\+ = morte
0 = sem sintomas

RESULTADOS

Os resultados mostram que a composição dos meios de cultura com peptona de soja, ou farinha de soja, adicionados aos meios de cultura, favorecem a formação de uma toxina tetânica mais potente que a obtida com a peptona Witte. Em um só caso (Prot. III) o título desta ultima peptona foi ligeiramente superior à farinha de soja.

A dosagem do valor antigênico das anatoxinas em cobaias revelou que as partidas preparadas com peptona de soja, ou peptona Witte, protegem quasi o mesmo número de cobaias injetadas com 10 DLM de toxina tetânica sêca, resultado esse superior ao obtido com a farinha de soja, cujas cobaias morreram no segundo dia, com sintomas típicos. A anatoxina tetânica preparada com peptona Witte, injetadas em 15 cobaias, 7 não tiveram sintomas, 2 com contrações tetânicas e 6 mortas; a anatoxina preparada com peptona de soja, 9 não apresentaram sintomas, 2 com contrações e 4 mortas de tétano.

DISCUSSÃO

O uso da peptona de soja no preparado de toxina e anatoxina tetânica, em substituição à peptona Witte, oferece vantagem sôbre a peptona Witte. Os resultados obtidos neste trabalho, onde as duas peptonas são comparadas, mostram que ambas favorecem a formação de uma toxina tetânica altamente toxígena e a anatoxina tetânica, delas resultantes, protege cobaias injetadas com 10 DLM de uma toxina sêca, porém o custo elevado da peptona Witte a torna proibitiva. O meio de cultura, contendo a farinha de soja, apesar de produzir uma toxina tambem violenta, quando transformada em anatoxina, não protege cobaias injetadas com aquela dose de toxina sêca. As cobaias testemunhas injetadas com 1 DLM morrem entre o 2.º e 4.º dia.

CONCLUSÃO

A peptona de soja, empregada neste trabalho, em um meio de cultura produz uma toxina tetânica altamente toxígena; transformada em anatoxina e injetada na dose de 1 cc protege 11 em 15 cobaias inoculadas com 10 DLM de toxina tetânica sêca.

RESUMO

Os autores empregaram na composição de um meio de cultura, para obtenção de toxinas tetânicas potentes e anatoxinas de valor antigênico elevado, peptona de soja, peptona Witte e farinha de soja.

Os resultados mostraram que com todos esses 3 meios de cultura obtêm-se toxinas de títulos elevados; as anatoxinas resultantes, quando provadas em cobaias, protegeram 11/15 (peptona de soja), 9/15 (peptona Witte) e 0/15 (farinha de soja).

A STUDY OF THE INFLUENCE OF THE MEAL AND PEPTONE OF SOYBEAN AND WITTE'S PEPTONE ON THE PRODUCTION OF TETANAL TOXIN AND ON THE ANTIGENICITY OF THE TOXOID

Abstract

Soybean meal, soybean peptone and Witte's peptone were used in the composition of three culture media for the production of tetanal toxin.

The three media produced high level toxin. The levels of antigenicity of the corresponding toxoids were tested in guinea pigs. They protected 11 out of 15 animals (*soybean peptone*), 9/15 (*Witte's peptone*) *and* 0/15 (*soybean meal*).

BIBLIOGRAFIA

1) Berthelot, A., Ramon, G. & Amoureux, G. — 1927 — Sur les conditions du milieu qui influencent la production de la toxine tétanique. *C. R. S. Biol.*, **96**: 32-34.

2) Berthelot, A., Amoureux, G. & Denise, U. F. — 1934 — Sur les avantages de la peptone pepsique de tourteau de soja pour la preparation des milieux de culture. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **16**: 1565-1567.

3) Bier, O. — 1951 — Bacteriologia e Imunologia. Edições Melhoramentos, pg. 701.

4) Legroux & Ramon, G. — 1933 — Sur la production de la toxine tétanique. *C. R. S. Biol.*, **113**: 861.

5) Mueller, H. J. & Miller, P. A. — 1945 — Production of tetanal toxin. *J. Immun.*, **50**: 377-389.

6) Mueller, H. J. & Miller, P. A. — 1947 — Factors influencing the production of tetanal toxin. *J. Immun.*, **56**: 143-147.

7) Ramon, G., Amoureux, G. & Pochon, J. — 1943 — Preparation de la toxine tétanique à l'aide de digestion papainique de viande et de foie de chéval. *C. R. S. Biol.*, Paris: 350-51.

———o———

Vol. 24 — Artigo 20 Dezembro de 1957

EXTERMINAÇÃO OU CONTRÔLE DE PLANTAS LENHOSAS E ARBÓREAS NAS PASTAGENS DE SÃO PAULO (*)

POR

M. Kramer

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 15 e 16

A destruição ou redução substancial das plantas nocivas nos pastos, principalmente, das ervas lenhosas e arbustos, é um objetivo primário de uma exploração pastoril racional. Quando o pasto fica coberto de uma vegetação rasteira daninha, como sejam ervas espinhosas ou duma vegetação arbórea indesejavel, constituida de arbustos das mais diversas espécies e porte, estas pragas consomem inutilmente a fertilidade do solo, o terreno fica sombreado e perdido para o desenvolvimento da forragem, ao passo que o gado passa fome e se põe em risco sua própria vida.

O presente artigo relata, neste sentido, os trabalhos de orientação para eliminar os dois tipos mencionados de vegetação invasora, rasteira e arbórea, das pastagens brasileiras. Esses trabalhos foram empreendidos a pedido dos interessados, criadores que não estavam obtendo os resultados desejados com o emprêgo de ervicidas do tipo hormonal.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensáios foram realizados em 1954 na Fazenda Santa Mariana (Caçapava) e no Haras Guanabara (Arapeí, Município de Bananal).

Na Fazenda Santa Mariana, a pastagem, para a criação de gado leiteiro, estava toda coberta de arbustos, numa infestação média de 1.500 - 2.000 pés por hectare, particularmente, de plantas das familias das Mirtáceas (*Myrcia* sp. = gua-mirim ou guamirim; *Campomanesia aurea* Berg. = guabiroba do campo ou araçá do campo); das Leguminosas (*Stryphnodendron adstringens* M. = barbatimão; *Platypodium elegans* Vog. = perobinha do campo ou amendoim do cerrado); das Melastomáceas (*Miconia stenostachya* DC. = jacatirão do campo) e das Myrsináceas (*Rapanea* sp. = capororóca branca).

Nesta propriedade, as tentativas de contrôle dos arbustos haviam sido iniciadas pelo fazendeiro em Setembro de 1953, com o emprêgo do produto *Esteron Brush Killer*, um ervicida contendo

(*) Trabalho apresentado à 6.ª Reunião Anual da Sociedade Botânica do Brasil, em Belém (Pará), em 26 de Janeiro de 1955.

novos e poderosos esteres de baixa volatilidade dos ácidos 2,4-D e 2,4,5-T. Ele fôra aplicado, conforme as instruções dos fabricantes, em pincelamento, nos tocos das plantas cortadas a 20 centímetros do solo. O produto havia sido diluido a 4% em óleo diesel.

Nossas experiências, iniciadas em 20-2-54 nesta Fazenda, previram a continuação do emprêgo do mesmo arbusticida *Esteron Brush Killer*, em solução idêntica, a 4% do produto comercial em oleo diesel, diante de alguns resultados preliminares promissôres. A composição do referido produto, em ingredientes ativos, era: 34,8% de esteres propileno-glicol-butílico do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, de escassa volatilidade, em mistura com 33,2% de esteres propileno-glicol-butílico do ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, o que correspondente, em ácido equivalente, a 2 libras por galão (907 grs. por 3,875 litros) de cada um dos ingredientes.

Demarcámos, na referida Fazenda Santa Mariana, 4 áreas para observações: I) podada e já tratada uma vez por pincelamento da base do tôco com o ervicida; II) podada e já tratada duas vezes, uma na base do tôco e outra na base dos rebrotos; III) pincelada duas vezes, a primeira vez por iniciativa do fazendeiro na base do tôco podado e a segunda vez por nossa iniciativa, no colo e parte superior do sistema radicular, descoberto numa extensão de 20 centímetros em forma de bacia; IV) pincelada uma só vez ao redor e ao longo de cêrca de 50 centímetros da base do tronco intacto dos arbustos.

Em cada área, cujas duas primeiras mediam 15 x 17 metros e as duas ultimas 10 x 10 metros, fizemos um levantamento de todas as plantas e realizámos 2 inspeções, nas datas de 24-4 e 17-11-54, para observarmos os resultados dos tratamentos.

Quanto ao Haras Guanabara, a pastagem, destinada à criação de equinos, estava intensamente infestada por uma erva rasteira, da família das Leguminosas, a "dormideira" ou "sensitiva": *Mimosa pudica* L., que depreciava a pastagem e cujos espinhos provocavam lesões na bôca e nos cascos dos animais. De permeio com esta praga, predominavam, também, nos piquetes de "capim de Rhodes" (*Chloris Gayana* Kunth.) e "Kikuio" (*Pennisetum, clandestinum* Hochst.) diversas outras ervas lenhosas e herbáceas, principalmente, da familia das Malváceas, como a "vassourinha" ou "guaxuma" (*Sida rhombifolia* L.).

Nesta propriedade, as tentativas de contrôle das ervas haviam sido iniciadas, pelo criador, com o emprêgo do produto 2,4-*D Amine Weed Killer*. Tratava-se de um produto cuja porcentagem de ingrediente ativo era 50% de ácido 2,4-diclorofenoxiacético como dimethylamina,

o que corresponde em ácido equivalente a 4 libras de 2,4-D por galão (1.814 grs. por 3,875 lts.).

Nossas experiências, iniciadas em 19-5-54 neste Haras, consistiram na organisação de 3 canteiros, tratando o 1.º deles com o citado produto, *2,4-D amina*, o 2.º com o *Weedone LV-4* e o 3.º canteiro com o *Weedone 2,4,5-T*, em pulverizações aquosas a 1%.

O *Weedone LV-4* é um produto de baixa volatilidade, que encerra 62,4% do ingrediente ativo, como ester butoxi-etanolico do ácido 2,4-diclorofenoxiacético; e o *Weedone 2,4,5-T* é um ervicida, também de escassa volatilidade, que encerra 58,5% de ester butoxi-etanolico do ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético.

As áreas demarcadas, nos piquetes do Haras Guanabara, tinham 20 metros quadrados, sendo pulverizadas com 2 litros de solução, cada uma. Contagens das ervas foram efetuadas na ocasião, uma inspeção realizada em 10-8 e informações adicionais sôbre o andamento dos ensáios foram obtidas através de cartas.

Tratando-se de uma área geográfica com elevada precipitação pluviométrica, decidimos incluir, no momento da diluição, o Triton X-100 na concentração de 0,5%, para aumentar a embebição das fôlhas das ervas pela solução do ervicida e a adesividade dos tratamentos.

RESULTADOS

Contrôle dos arbustos na Fazenda Santa Mariana: Das observações visuais tomadas em 24-4-54, nos lotes tratados, isto é, 7 meses após o tratamento nas quadras I e II, e 2 meses após o tratamento nas quadras III e IV, notamos que: 1) Na quadra I, em que as plantas tinham sido podadas e tratadas uma só vez na base do tôco com o ervicida, apenas cerca de 25% das plantas tinham perecido.

2) Na quadra II, podada e já tratada duas vezes, uma na base do tôco e outra na base dos rebrotos, atualmente, cêrca de 50% das plantas estavam mortas.

3) Na quadra III, pincelada 2 vezes, a 1.ª, há 5 meses, no tronco podado e a 2.ª, há 2 meses, abaixo do nivel do solo, isto é, no colo e parte superior do sistema radicular, descoberto numa extensão de 20 centimetros em forma de bacia, verificámos resultados positivos de morte aparente dos arbustos em 100% dos casos.

4) A destruição total aparente foi tambem observada na quadra IV, em que pincelámos uma só vez 50 centímetros da base do tronco intacto dos arbustos.

Uma 2.ª observação, efetuada em 17-11, praticamente, 9 meses após a 2.ª série de tratamentos, revelou que: a) Na quadra

I, cêrca de 30% das plantas tratadas estavam agora mortas, a maioria, porém, rebrotou completamente.

b) Na quadra II, aproximadamente, 60% das plantas tinham perecido, mas, as demais plantas rebrotaram vigorosamente.

c) Nas quadras III e IV, que organizámos pessoalmente, resultados positivos de destruição foram obtidos por cálculo, em mais de 90% dos casos e, no máximo, 10% das plantas tornaram a emitir brotos, sendo êsses, porém, bem fracos.

Os resultados gerais estão relacionados no quadro seguinte:

TABELA I

Contrôle de arbustos na Fazenda Sta. Mariana com *Esteron Brush Killer* a 4% em oleo diesel, sob diversas modalidades de aplicações

Tipo de Arbusto	Aplicação com pincel							
	Tratamento unico do tôco (*)		Tratamento duplo, no tôco e na base dos rebrotos (**)		Tratamento duplo no tôco e abaixo do colo (***)		Tratamento único, de 50 cms. da base do tronco intacto (****)	
	Plantas vivas tratadas	Plantas com sintomas letais	Plantas vivas tratadas	Plantas com sintomas letais	Plantas vivas tratadas	Plantas com sintomas letais	Plantas vivas tratadas	Plantas com sintomas letais
Guamirim	42	12	94	48	× 20	18	× 8	8
Araçá do campo	13	0	7	0	× 2	2	× 2	2
Barbatimão	8	0	2	0	—	—	× 2	1
Jacatirão do campo .	8	1	3	0	× 2	2	× 4	4
Capororóca	—	—			1	1	—	—

* O tratamento foi realizado em 10-9-53
** O tratamento foi realizado em 10-9-53 e 19-11-53
*** O tratamento foi realizado em 10-9-53 e 20-2-54
**** O tratamento foi realizado em 20-2-54.
Observações finais em 17-11-54.

Contrôle das ervas lenhosas no Haras Guanabara: As informações obtidas 1 semana depois da aplicação dos ervicidas demonstraram aspectos iguais para os 3 canteiros. Tanto as plantas velhas como as novas de "sensitiva" (*Mimosa pudica*) já haviam perdido a sensibilidade ao toque, nesta primeira semana da aplicação; nas plantas velhas, começavam a amarelecer as fôlhas e, nas novas, as pontas estavam enegrecidas. As outras pragas, especialmente a "guaxuma" (*Sida*), estavam começando a demonstrar o efeito dos ervicidas.

No dia 3 de Junho, apenas 2 semanas após os tratamentos, a parcela III, tratada com o Weedone 2,4,5-T demonstrava o melhor efeito do ervicida, as fôlhas da "sensitiva" já haviam secado, porém as hastes ainda estavam verdes. As parcelas I e II, tinham ainda

"sensitiva" com fôlhas verdes, mas sem sensibilidade. As outras pragas mostravam os mesmos sintomas da semana anterior.

No dia 10 de Junho, a área da experiência n.º III apresentava, no fim desta 3.ª semana, o melhor aspecto de aniquilamento. As fôlhas já tinham caido totalmente na 2.ª semana, e agora as pontas também estavam murchando. A "guaxuma", por sua vez, enegreceu toda. Nas áreas I e II, ainda havia "sensitiva" com algumas fôlhas.

Em 24 de Junho, com 35 dias de observação, a melhor parcela de contrôle ainda era a IIIa, na qual as hastes continuavam a secar, havendo porém, acima da terra, ainda partes verdes.

Em 10 de Julho, após 50 dias de observação, o estado da "sensitiva", na parcela III continuava a ser o pior, com séca da parte aérea e com murchamento do tronco na região do colo, indicando um completo aniquilamento das plantas.

Em 11 de Agosto, verificámos que, dentre os ervicidas utilizados, a *amina do 2,4-D* deu os resultados mais fracos, depois de 80 dias da sua aplicação. De fato, apenas cerca de 10% das ervas, pareciam afetadas letalmente, ao passo que a maioria mostrava danos somente nos ponteiros. Os melhores resultados de contrôle foram obtidos com o ester de baixa volatilidade do *ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético*: observamos, nesta quadra III, tratada com o referido produto, a séca total de ambas as principais ervas em aprêço, não havendo o menor sinal de rebrota nos tocos e hastes. O outro ester, também de baixa volatilidade, do *ácido 2,4-diclorofenoxiacético*, aplicado na quadra II, deu resultados intermediários, isto é, sua ação foi letal para as "guaxumas", mas, apenas 10% das "sensitivas" estavam aparentemente mortas na ocasião; o restante fôra afetado particularmente nas pontas, deixando as hastes ainda verdes e com tendência à rebrota.

Os resultados gerais obtidos estão relacionados no quadro seguinte:

TABELA II

Contrôle de ervas daninhas lenhosas no Haras Guanabara, por meio de pulverisação aquosa com diversos ervicidas (*)

Tipo de erva	Parcela I — 2,4-D amina a 1%		Parcela II — Weedone LV4 (2,4-D ester) a 1%		Parcela III — Weedone 2,4,5 T (2,4,5-T ester) a 1%	
	Plantas vivas tratadas	Plantas c/ sintomas letais	Plantas vivas tratadas	Plantas c/ sintomas letais	Plantas vivas tratadas	Plantas c/ sintomas letais
Sensitiva	57	5	75	8	43	43
Guaxuma	44	5	30	28	32	32

(*) O tratamento foi feito em 19-5-1954. Observações em 10-8-54.

DISCUSSÃO

Comparando a situação da infestação dos pastos brasileiros pelas duas espécies muito difundidas, "leiteiro" (*Tabernaemontana fuchsiaefolia* D. C.) e "amendoim do campo" (*Pterogyne nitens* Ful.) com a de diversas outras espécies invasoras individuais de arbustos lenhosos das nossas áreas experimentais, dentre as quais o "guamirim", o "jacatirão do campo" e o "araçá do campo" na zona de Caçapava, e a "sensitiva" e a "guaxuma" na zona de Bananal, observa-se a grande analogia existente entre o modo de disseminação destas espécies nocivas e as dificuldades para o seu contrôle.

O "leiteiro" e o "amendoim", exemplares tipicos das espécies individuais que infestam as pastagens do Brasil central, são caracterizados por um sistema radicular muito extenso, e têm capacidade de rebrotar tanto de pedaços de raizes e de hastes deixadas no solo, como também, de sementes, sendo a erradicação destas espécies dificil, custosa e quase impraticável, em larga escala, pelos métodos manuais ou mecânicos (16).

Na zona de Caçapava, o "guamirim", por exemplo, uma das espécies dificeis de destruir por métodos manuais, é caracterizado por uma vigorosa rebrota a partir da área do colo radicular. As tentativas anteriores para controlar esta espécie pela roçada ou pela queima falharam, porque a unica ou duas hastes iniciais eram substituidas por 10 a 50 novas, todas provenientes da região do colo radicular, enquanto o desenvolvimeno das raizes se tornava, cada vez, ainda mais extenso. Igualmente falhas eram as praticas mecânicas contra as "sensitivas" e "guaxumas", na zona de Bananal, devidos ás frequentes rebrotas e intensa capacidade de produção de sementes dessas duas espécies.

Para extirpar, com resultados mais satisfatórios, os arbustos e ervas lenhosas, recorreu-se, então, aos tratamentos químicos, com a aplicação dos hormonios ervicidas ou arbusticidas.

Indicações de que o método químico é um método eficiente e pratico de erradicação das plantas lenhosas e que esse método tem se desenvolvido muito ultimamente, encontram-se nos trabalhos de Day (4, 5, 6), Hackett (8), Hyder (11), Buchholtz (1), Davis (3), Phillips (15) e outros. A maioria destes processos envolve o uso do 2,4-D ou 2,4,5-T. Estas duas substâncias são usadas isoladamente ou juntas, tanto em soluções oleosas como aquosas. Para a eliminação das plantas lenhosas, recomendam geralmente preparações dos vários esteres do 2,4-D e 2,4,5-T. O sal aminado do 2,4-D é também, às vezes, usado.

No que se refere, porém, ao contrôle direto de Mirtáceas e Leguminosas, pragas de pastagens, HOSAKA & THISTLE (10) e RIPPERTON & HANSON (17) tratam dos bons resultados obtidos em Hawaii no contrôle da "goiaba" (Guava = *Psidium guajava* L.) e da "esponjinha" (Klu = *Acacia farnesiana* L.) com 2,4-D dissolvido em óleo leve ou com ervicidas contendo 2,4-D e 2,4,5-T, adotando o tratamento basal da casca para arbustos maiores e pulverizações da folhagem com 2,4-D em água para as plantas pequenas. No caso dos tratamentos da casca, a diluição mais recomendada é de cêrca de 1:25 (isto é, 1 galão de ester em 25 galões de óleo ou, aproximadamente 4%). Trata-se, pois, da mesma dosagem adotada em nossas experiências de Caçapava (tabela I), si bem que esses autores mencionem ainda morte completa de plantas arboreas com uma só aplicação basal de ester em óleo, em diluições variando de 1 para 50 a 1 para 10.

Os ensaios de orientação, feitos em Bananal e resumidos na Tabela II, mostram também que o ervicida, composto do ester do 2,4,5-T a 1%, produziu um exterminio bastante rápido dos exemplares de "guaxuma" e "sensitiva". Neste ponto, nossas experiências confirmaram as observações anteriores de PAIXÃO (13, 14), que, visando o contrôle da "falsa guaxima" ou "malvasco" (*Sida micrantha* ST. HIL.) na zona da Mata em Minas Gerais, obteve otimos resultados com os esteres do 2,4-D e do 2,4,5-T na concentração de 1%. Mas, por outro lado, encontram-se tambem na literatura referências não muito favoraveis, como a dos pesquisadores argentinos DOMATO & ARAMAYO (7), que, numa primeira apreciação de ervas tratadas com 2,4-D, consideraram a "Afata" (*Sida* sp.) como medianamente suscetível.

Outras citações, relativas ao contrôle e à invasão específica das pastagens por "mimosas" e diversas espécies de *Acacia*, portadoras de espinhos, encontram-se também nos trabalhos de HATTINGH (9), de VAN DE GOOR (18), de CRAFTS (2) e de NAMBIER (12). HATTINGH, na Africa do Sul, com referência a Acacias, e embora reconhecendo toda a complexidade do problema, em conseqüência do diferente valor dos veículos aquosos, oleosos e suas emulsões, do efeito das épocas de aplicação e do estado do crescimento dos arbustos, considerou mais eficientes, para as plantas arboreas, as aplicações basais de uma combinação dos esteres de butoxietanol de 2,4-D e 2,4,5-T em óleo diesel a 1%, do que o mesmo produto a 1% aplicado em água.

Por outro lado, VAN DE GOOR, na Indonesia, estudando o comportamento de *Mimosa invisa*, conseguiu averiguar que esta espécie é dificilmente afetada, de modo letal, por pulverizações feitas com

Agroxone (MCPA) em concentrações até 0,2%. Mas, o Agroxone, é um ervicida suave, que se assemelha na ação ao sal sódico do 2,4-D, menos eficaz contra as espécies resistentes do que as formas de esteres do 2,4-D ou 2,4,5-T.

Já CRAFTS, nos E. Unidos, entretanto, referindo-se à *Mimosa pudica,* cogitada neste nosso trabalho, frizou que esta espécie pode é um ervicida suave, que se assemelha na ação ao sal sódico do 2,4-D, em óleo aromático e água, tecnica essa que, com pequena modificação, nos serviu de base e permitiu comparações com a nossa mistura, de ervicida em água e agente espalhante-adesivo. O fato de eliminarmos o veículo oleoso da mistura visava apenas evitar a eventualidade de uma queima dos capins, observada num ensaio preliminar de campo, sem que, com isso, fosse afetada, como expusemos, a eficiência do produto.

Quanto ao trabalho de NAMBIER & SAHADEVAN, mesmo se referindo especificamente à *Mimosa pudica,* serve aqui apenas como citação, por se tratar de contrôle da erva por pulverizações de arsenito de sódio a 3%.

Resta-nos aduzir agora, ainda, as razões do melhor efeito, observado nos métodos de aplicação 3 e 4, relativo aos arbustos de Caçapava.

No caso do tratamento 3, em que a segunda aplicação do ervicida foi realizada no colo abaixo do nivel do solo, poder-se-ia pensar, em primeiro lugar, na possibilidade de uma influência do aumento da área de tratamento na planta. Temos razões para acreditar, porém, que, neste caso, o comportamento mais suscetível dos arbustos se explica também pelo fato de haverem sido atingidos, no tratamento repetido, partes sensiveis subterraneas da base do tronco e as gemas dormentes do colo, das quais resultam em bôas condições a nova brotação. De fato, encontramos referências na literatura (p. e. DAY, 1948) de que os arbustos podem ser mortos apenas pela destruição dos tecidos que dão nascimento aos brotos. Aliás, pode-se dizer que essa opinião está agora implicita em muitos trabalhos e nas instruções dos fabricantes de arbusticidas, ao recomendarem o tratamento cuidadoso da casca dos arbustos daninhos com as substâncias químicas, até o escorrimento do produto ao nivel do solo.

No que se refere ao tratamento 4, em que a aplicação do ervicida foi realizada numa faixa de 50 centímetros da base do tronco intacto dos arbustos, consideramos êsse método mais eficiente e menos dispendioso que o tratamento dos tôcos, por ser essencial um volume adequado do produto para uma cobertura completa da parte basal da haste capaz de ocasionar a destruição da planta, e por não exi-

gir o córte dos arbustos, sendo, assim, provavelmente, mais lógico, por não alterar a fisiologia da planta.

As aplicações, porém, poderão ser realizadas tanto com o pincel, que é um processo lento e custoso, mas tem sido usado efetivamente, como por meio de um pulverizador de costas, empregando-se, neste caso, bico que forneça uma pulverização grosseira.

RESUMO

Formulações de *Esteron Brush Killer* a 4% por volume em óleo diesel, foram aplicadas, em pincelamento do tronco, a Mirtáceas (Guamirim, Araçá do campo), Leguminosas (Perobinha do campo, Barbatimão) e outras espécies arbustivas, na região de Caçapava, Estado de S. Paulo, durante o ano de 1954.

Os tratamentos basais, que consistiram em aplicações feitas a 50 centímetros da base das hastes intactas ou, apenas, a 20 centímetros da área do colo das hastes podadas, foram mais eficientes do que as simples aplicações, por pincelamento, da base das hastes podadas a 20 centímetros do solo. Foi observado ser fundamental tratar cuidadosamente e aplicar uma quantidade suficiente até escorrimento do produto ao nível do solo.

Formulações de *2,4-D amina, Weedone LV-4* (ester do 2,4-D) e *Weedone 2,4,5-T* (ester do 2,4,5-T), foram aplicadas, em pulverizações aquosas a 1%, na folhagem de Leguminosas (Sensitiva), Malváceas (Guaxuma) e outras espécies de ervas lenhosas invasoras de pastagens, na região de Bananal, Estado de São Paulo, durante 1954. Os tratamentos com a mistura aquosa a 1% do ester do 2,4,5-T foram mais eficientes do que os dos outros produtos ensaiados. Praticamente, não houve danos aos pastos com estas aplicações.

CHEMICAL CONTROL OF SHRUBS, BRAMBLES AND WOODY PLANTS IN THE PASTURES OF S. PAULO

Abstract

Experiments to determine the best way to use hormone weed killers in the basal treatments or in foliage sprays of some woody plants, were begun at Caçapava (Fazenda Santa Mariana) and Bananal (Haras Guanabara), State of São Paulo, Brazil, in the summer and fall of 1954.

At Caçapava, exploratory tests with Esteron Brush Killer (2,4-D/2,4,5-T mixtures of low-volatile esters), at a concentration of 4 per cent by volume in diesel oil, were made by brushing the trunk of "guámirim" (Myrcia sp.), "araçá do campo"

(Campomanesia alba), "perobinha do campo" (Platypodium elegans), "barbatimão" (Stryphnodendron adstringens) and some other bushy species.

The basal bark treatments, applied only to the basal portions of shrub stems or tree trunks of the mentioned species, to a height of 20 to 24 inches from the ground; or, applied directly to the stumps and the exposed 8 inches root collars, were more effective than the single applications on the stumps, cut to a height of 8 inches from the ground.

At Bananal, 2,4-D Amine Weed Killer, Weedone LV-4 (Butoxy ethanol ester of 2,4-D) and Weedone 2,4,5-T (Butoxy ethanol ester of 2,4,5-T) formulations were used in foliage spray applications, at 1 per cent by volume in water with a spreader (Triton X-100), to "sensitive" (Mimosa pudica), "guaxuma" (Sida rhombifolia) and some other noxious shrubs and brambles of the pastures. The most promising treatment was achieved by the chemical 2,4,5-T sprayed on different parts of the plants.

Over 90 per cent topkill was obtained in both conditions. Some retreatment may be necessary. Practically, grasses were not damaged by such applications.

BIBLIOGRAFIA

1) Buchholtz, K. P. & G. M. Briggs — 1953 — Weed control in Field Crops. Circular 47, Wisconsin College of Agriculture, Madison, 13 pgs.

2) Crafts, A. S. — 1948 — Weed Control in the Tropics. *Science*, Vol. 107 (2773): 197.

3) Davis, A. M. — 1955 — Chemical Weed Control. *Arkansas Agric. Exper. Sta.* (Fayetteville). Mimeograph Series N. 2.

4) Day, Maurice W. — 1948 — The Chemical Control of certain forest shrubs. A Progress Report. *The Quart. Bull* (Michigan) 30 (4): 427-436.

5) Day, Maurice W. — 1950 — How to control undesirable trees and shrubs. *The Quart. Bul.* 32 (4): 486-491.

6) Day, Maurice W. — 1952 — Controlling Alder with Basal Stem Sprays. *The Quart. Bul.* 34 (4): 354-356.

7) Domato, José & Humberto Aramayo — 1947 — Las Hormonas y sus posibles aplicaciones en la agricultura. *Bol.* n.° 62, *Estacion Exper. Agrícola de Tucuman*, Argentina.

8) Hackett, David P. — 1951 — Experiments on the chemical control of harwoods in Northeastern forests. Harward University (Mimeogr.).

9) Hattingh, E. R. — 1951 — Can weed-killers be used in Thorn Scrub Control? *Proc. First Southern African Weed Control Conference* (Univ. of Witwatersrand, Johannesburg): 43-48.

10) Hosaka, E. Y. & Alan Thistle — 1954 — Noxious Plants of the Hawaiian Ranges. *Univ. of Hawaii Extension Bul.* n.° 62.

11) Hyder, Donald N. — 1953 — Controlling Big Sagebrush with Growth Regulators. *Jour. Range Management* 6 (2): 109-116.

12) Nambier, R. R. & P. C. Sahadevan — 1948 — The sensitive plant as a weed and its control. *Madras Agric. Jour.* 35 (9): 233-235.

13) Paixão, J. C. — 1954 — Combate químico às invasoras de pastagens. Informação técnico-cientifica n.° 18. S.I.A.M.A.

14) Paixão, J. C. — 1954 — Contrôle do "Alecrim do Campo (*Baccharis Dracunculifolia* DC) com esteres do 2,4-D e do 2,4,5-T. *Revista Agronomia* 13 (3-4): 233-237.

15) Phillips, Wm. M. C. H. Meadors Jr., C. E. Fisher, R. A. Darrow & W. G. McCull — 1953 — Extirpação da mesquita nos campos de pasto. *A Fazenda* (N. Y.).

16) Quinn, L. R., K. J. Swierczynski, W. L. Schilmann & F. H. Gullöve — 1956 — Programa Experimental de Contrôle de Arbustos em Pastagens Brasileiras (Experimental Program on Brush Control in Brazilian Pastures). *Bol. n.° 10, IBEC Research Institute.*

17) Ripperton, J. C. & N. S. Hanson — 1952 — The control of woody plants on Hawaiian Ranges. *Hawaii Agric. Exp. Sta. Progress Notes* n.° 78.

18) Van de Goor, G. A. W. — 1950 — Weed Control with Synthetic Growth Hormones. *Bul. n.° 108, Gen. Agr. Res. Sta., Bogor,* Indonesia.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 15

Fig. A — Caçapava (Fazenda Santa Mariana). Vista geral da pastagem bem infestada de arbustos.

Fig. B — Pincelamento de 50 cms. do tronco intacto da *Myrcia* sp. ("guamirim"). (Foto em 21-2-54).

Fig. C — Pincelamento da base do tôco e colo radicular do "guamirim" (canteiro III, em 21-2-54).

Fig. D — Pincelamento de 50 cms., da base do tronco intacto, de *Platypodium elegans* ("perobinha do campo"). (canteiro IV, em 21-2-54).

Fig. E — "guamirim" morto, por um só tratamento no tôco. (canteiro I, em 20-2-54).

Fig. F — "guamirim" rebrotado após o 1.° tratamento no tôco, há 6 meses. (Foto em 20-2-54).

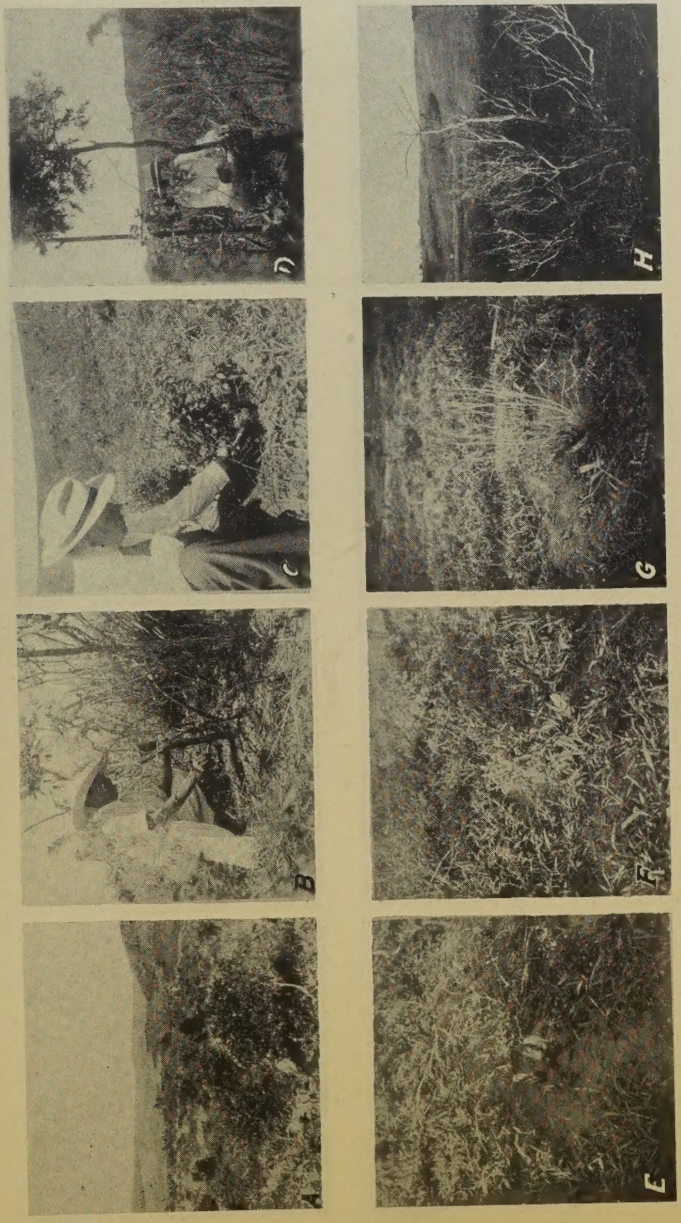
Fig. G — "guamirim", cuja rebrota secou, pela repetição do tratamento na região do colo e abaixo do nivel do solo. (canteiro III, em 25-4-54).

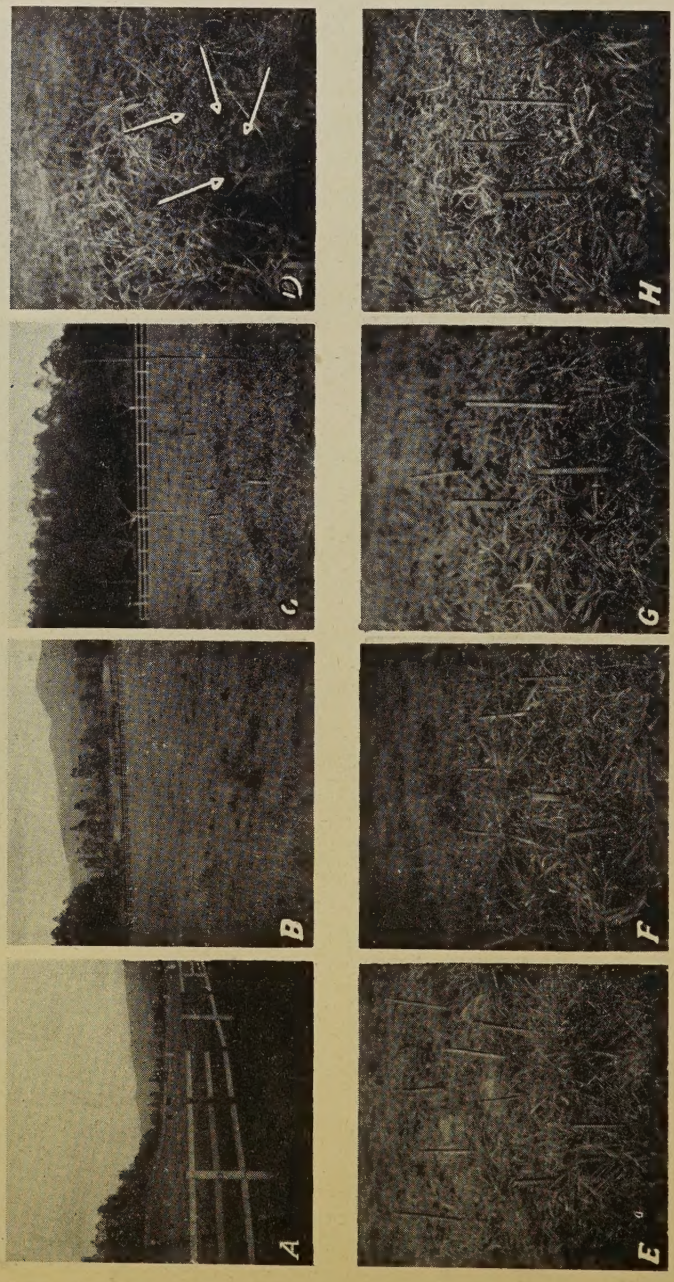
Fig. H — Grupo de *Platypodium, Myrcia, Miconia* e *Campomanesia,* sêcos, pelo tratamento do tronco intacto. (canteiro IV, em 25-4-54).

Estampa 16

Fig. A — Bananal (Haras Guanabara). Vista geral dos piquetes.
Fig. B — Vista geral do piquete tratado.
Fig. C — Aspecto geral do canteiro III.
Fig. D — *Mimosa pudica* ("dormideira") aparecendo entre os capins.
Fig. E — Efeito no canteiro I. As estacas indicam a localização do grande número de ervas invasoras vivas.
Fig. F — Efeito no canteiro II. Nota-se um menor número de ervas vivas, principalmente de *Sida rhombifolia* ("guaxuma").
Fig. G — Efeito no canteiro III. Vê-se a parcela praticamente livre das ervas lenhosas.
Fig. H — Detalhe do efeito no canteiro III.

(Fotos em 11-8-54).


D
H
C
G
B
F
A
E


A
B
C
D
E
F
G
H

SÃO PAULO
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
TIPOGRAFIA BRASIL
Rua Brigadeiro Tobias, 647-653
1 9 5 8